

**Etablierung eines induzierbaren Zellkulturmodells zur
Untersuchung transkriptioneller Interferenz**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Helena Sophie Barbara Heinz

aus Freiburg im Breisgau
April 2016

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke
2. Gutachter: Prof. Dr. George Iliakis
3. Gutachter: -

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Dominik Boos

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Transkription in Eukaryoten.....	9
1.2	Aufbau eukaryotischer Promotoren.....	12
1.3	Transkriptionelle Interferenz	14
1.4	TI durch konvergente Promotoranordnung	17
1.4.1	Unterdrückung der paternalen <i>UBE3A</i> -Transkription in Neuronen	17
1.4.2	Unterdrückung der <i>HBA2</i> -Transkription in Patienten mit α -Thalassämie.....	21
1.5	TI durch Tandem-Promotoranordnung: Unterdrückung der <i>MSH2</i> -Transkription in Patienten mit Lynch-Syndrom.....	23
1.6	Modelle der transkriptionellen Interferenz	25
1.6.1	Promotor-Konkurrenz	25
1.6.2	„Sitting-Duck“-Interferenz	26
1.6.3	Transkriptions-Blockade	28
1.6.4	Promotor-Okklusion	29
1.6.5	RNA-Polymerase-Kollision.....	30
1.7	Zielsetzung.....	33
2	Material und Methoden	34
2.1	Materialien.....	34
2.1.1	Chemikalien.....	34
2.1.2	Puffer, Medien und Lösungen	34
2.1.3	Organismen	38
2.1.4	DNA-Größenstandards.....	40
2.1.5	Oligonukleotide.....	41
2.1.6	Plasmide.....	41
2.2	Kulturtechniken und zellbiologische Methoden.....	44
2.2.1	Auftauen kryokonservierter Zellen	44
2.2.2	Kultivierung der murinen embryonalen Stammzellen	44
2.2.3	Neuronale Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen	45
2.2.4	Kultivierung der humanen Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293	45
2.2.5	Transiente und stabile Transfektion.....	46
2.2.6	Selektion transgener Zellen	47
2.2.7	Isolation transgener Zellklone	47
2.2.8	Kontrolle transgener Zelllinien mittels <i>lacZ</i> -Test	48

2.2.9	Doxycyclin-Behandlung der transgenen Zelllinien	49
2.2.10	Kryokonservierung der Zellen	49
2.3	Molekularbiologische Methoden	50
2.3.1	Isolation von Nukleinsäuren	50
2.3.2	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	52
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	53
2.3.4	Reverse Transkription von RNA	54
2.3.5	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	54
2.3.6	Agarose-Gelelektrophorese	55
2.3.7	Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	56
2.3.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	56
2.3.9	Insertion PCR-vervielfältigter DNA-Fragmente in den TOPO-Vektor.....	56
2.3.10	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	56
2.3.11	Restriktionsendonukleaseverdau	57
2.3.12	Herstellung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden.....	57
2.3.13	Dephosphorylierung von Vektoren	58
2.3.14	Ligation von DNA-Fragmenten.....	58
2.3.15	Herstellung des Klonierungslinkers	58
2.3.16	Ortsspezifische Mutagenese	59
2.3.17	Gibson <i>Assembly</i>	59
2.3.18	Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	60
2.3.19	Bisulfit-Konvertierung.....	61
2.3.20	Hochdurchsatz-Bisulfit-Sequenzierung.....	61
2.3.21	Messung der Luciferaseaktivität.....	62
3	Ergebnisse	64
3.1	Transkriptabbruch der lncRNA <i>Snhg14</i> in murinen embryonalen Stammzellen	64
3.1.1	Auswahl und Klonierung des Homologiefragments zur Insertion der transkriptionellen Stoppkassette	64
3.1.2	Klonierung der transkriptionellen Stoppkassette	66
3.1.3	Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen in neuronale Zellen	67
3.2	Etablierung eines induzierbaren Zellkulturmodells zur Untersuchung von TI.....	69
3.2.1	Auswahl der Promotorregionen	69
3.2.2	Klonierung der Konstrukte für die Promotoraktivitätsanalyse	71
3.2.3	Aktivität der ausgewählten putativen Promotorregionen.....	74

3.2.4	Wirkung von Doxycyclin auf die Aktivität der ausgewählten Promotoren	76
3.2.5	Klonierung der Konstrukte für das Zellkulturmodell.....	77
3.2.6	Herstellung stabiler Zelllinien zur Untersuchung überlappender Transkription	80
3.2.7	Auswirkungen der überlappenden Transkription auf die EGFP-Proteinexpression.....	81
3.2.8	Auswirkungen der überlappenden Transkription auf die Genexpression	83
3.2.9	Einfluss der überlappenden Transkription auf den Methylierungsstatus der Testpromotoren.....	94
3.2.10	Aktivität der Testpromotoren nach beendeter Induktion der überlappenden Transkription.....	100
4	Diskussion.....	104
4.1	Transkriptabbruch der lncRNA <i>Snhg14</i> in murinen embryonalen Stammzellen	104
4.2	Etablierung eines induzierbaren Zellkulturmodells zur Untersuchung von TI	106
4.2.1	Voraussetzungen für die Untersuchung von TI in Flp-In™-T-REx™-293-Zellen.....	106
4.2.2	Die Zelllinie <i>UBE3A_AS</i> zeigt den stärksten Effekt durch TI	108
4.2.3	Die Zelllinien <i>HBA2-short_AS</i> und <i>HBA2-long_AS</i> zeigen einen vergleichbaren TI-Effekt	111
4.2.4	In der <i>Sense</i> -Zelllinie <i>MSH2</i> ist der TI-Effekt am schwächsten	115
4.2.5	Die Stärke des TI-Effekts ist im etablierten Zellkulturmodell abhängig vom integrierten Testpromotor	117
4.2.6	Im etablierten Zellkulturmodell ist der TI-Effekt reversibel.....	117
5	Ausblick.....	121
6	Zusammenfassung.....	122
7	Literaturverzeichnis.....	123
8	Anhang.....	133
8.1	Oligonukleotide.....	133
8.1.1	Oligonukleotide für den Transkriptabbruch der lncRNA <i>Snhg14</i>	133
8.1.2	Oligonukleotide für die Etablierung des Zellkulturmodells.....	136
8.2	DNA-Sequenzen der Testpromotoren	140
8.3	Plasmidkarten	144
8.3.1	Plasmid für den Transkriptabbruch der lncRNA <i>Snhg14</i>	144
8.3.2	Plasmide für die Etablierung des Zellkulturmodells	145

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
AFM	engl. <i>atomic force microscopy</i>
AS-SRO	engl. <i>Angelman syndrome smallest region of overlap</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	bakterielles artifizielles Chromosom (engl. <i>bacterial artificial chromosome</i>)
bp	Basenpaar
BRE	Transkriptionsfaktor-IIIB-Erkennungselement (engl. <i>TFIIB recognition element</i>)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
cen	Centromer
Cp	engl. <i>crossing point</i>
CpG	Dinukleotid aus Cytosin gefolgt von Guanin in 5'-3'-Orientierung
DCE	engl. <i>downstream core element</i>
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
Dox	Doxycyclin
DPBS	engl. <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DPE	engl. <i>downstream promoter element</i>
DRB	5,6-Dichlor-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol
EB	Embryoid-Körper (engl. <i>embryoid body</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (engl. <i>epidermal growth factor</i>)
EGFP	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>
ENCODE	engl. <i>Encyclopedia of DNA Elements Consortium</i>
FBS	fötales bovines Serum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FRT	engl. <i>Flp-recombinase target</i>

Abkürzungsverzeichnis

g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
H3K4me1	Monomethylierung des Lysins an Position vier des Histons H3
H3K4me3	Trimethylierung des Lysins an Position vier des Histons H3
H3K27ac	Acetylierung des Lysins an Position 27 von Histon H3
H3K27me3	Trimethylierung des Lysins an Position 27 von Histon H3
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-ethansulfonsäure
ICR	<i>Imprinting</i> -Kontrollregion (engl. <i>imprinting control region</i>)
kb	Kilobasen
konz	konzentriert
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LIF	engl. <i>leukemia inhibitory factor</i>
lncRNA	lange nicht-kodierende RNA (engl. <i>long non-coding RNA</i>)
m	Meter
m	milli
M	molar
mat	maternal
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mES-Zellen	murine embryonale Stammzellen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MID	engl. <i>multiplex identifier</i>
min	Minute
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MTE	engl. <i>motif ten element</i>
n	nano
ncRNA	nicht-kodierende RNA (engl. <i>non-coding RNA</i>)
p	kurzer Arm eines Chromosoms (franz. <i>petit</i>)
pat	paternal
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PolyA-Signal	Polyadenylierungssignal
PWS-IC	engl. <i>Prader-Willi syndrome imprinting center</i>
PWS-SRO	engl. <i>Prader-Willi syndrome smallest region of overlap</i>

Abkürzungsverzeichnis

q	langer Arm eines Chromosoms (franz. <i>queue</i>)
qRT-PCR	engl. <i>quantitative real-time PCR</i>
rBG	engl. <i>rabbit β-globin</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
snoRNA	engl. <i>small nucleolar RNA</i>
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
T	Thymin
T _A	Anlagerungstemperatur des <i>Primers</i>
TAE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TAF	TBP-assoziiierter Faktor
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
tel	Telomer
TF	Transkriptionsfaktor
TI	transkriptionelle Interferenz
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Enzymeinheit (engl. <i>unit</i>)
U	Uracil
U-Exon	engl. <i>upstream exon</i>
V	Volt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Transkription in Eukaryoten

Ein erwachsener Mensch besitzt circa 10^{13} Zellen, deren Identität durch die Transkription ihres Genoms bestimmt wird (Bianconi et al. 2013). Durch die Regulation der Transkription werden sämtliche Prozesse in einer Zelle kontrolliert und bereits geringfügige Änderungen der Transkription eines Gens können weitreichende Folgen für den gesamten Organismus haben. Daher ist die Transkription ein stark regulierter Prozess (Vaquerizas et al. 2009; Grünberg und Hahn 2013).

Für den Vorgang der Transkription sind DNA-abhängige RNA-Polymerasen erforderlich, die die Synthese der RNA katalysieren. Es wurden drei RNA-Polymerasen identifiziert, die in allen Eukaryoten vorkommen und sich in ihrer Funktion und der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten unterscheiden (Cramer et al. 2008). Diese werden als RNA-Polymerase I, II und III bezeichnet (Roeder und Rutter 1969). Die RNA-Polymerase I katalysiert die Synthese ribosomaler RNAs (rRNAs), während die RNA-Polymerase III auf die Produktion kurzer, nicht-kodierender RNAs, wie beispielsweise Transfer-RNAs (tRNAs), spezialisiert ist (Grummt 1999; White 2011). Alle Protein-kodierenden Gene werden von der RNA-Polymerase II transkribiert. Zusätzlich dazu ist diese RNA-Polymerase aber auch für die Synthese vieler nicht-kodierender RNAs verantwortlich (Lee und Young 2000; Tudek et al. 2015).

Für die Initiation der Transkription bindet die RNA-Polymerase II, zusammen mit den allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF und TFIIH, spezifisch an eine DNA-Sequenz, die als Promotor bezeichnet wird. Hierbei vermitteln TFIIB und TFIID die Rekrutierung der RNA-Polymerase II zum Promotor. TFIID umfasst das TATA-Box-Bindeprotein (TBP), welches für die Transkription der meisten Promotoren benötigt wird, und verschiedene TBP-assoziierte Faktoren (TAFs), die Promotor-spezifische Funktionen besitzen. Zusammen mit der Promotor-DNA bilden die Faktoren TFIIB und TBP einen Komplex, der von der RNA-Polymerase II und dem mit ihr assoziierten Faktor TFIIIF gebunden wird. Auf diese Weise entsteht der sogenannte Kern-Initiationskomplex. Durch die Bindung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIIE und TFIIH an diesen Komplex entsteht daraus der sogenannte Prä-Initiationskomplex, welcher die noch doppelsträngige Promotor-DNA umschließt. Im Anschluss daran vermittelt der Faktor TFIIH, unter Einsatz von ATP, das Aufschmelzen einer zentral gelegenen DNA-Region, wodurch die sogenannte Transkriptionsblase aus einzelsträngiger DNA gebildet wird und der offene Promotor-Komplex entsteht. Nach der Ausbildung des offenen Promotor-Komplexes

befindet sich der DNA-Matrizenstrang in der Nähe des aktiven Zentrums der RNA-Polymerase II. Mithilfe der Faktoren TFIIB und TFIIF kann nun der Transkriptionsstartpunkt der DNA-Matrize ermittelt und anschließend die RNA-Synthese eingeleitet werden (Grünberg und Hahn 2013; Sainsbury et al. 2015).

Die Verknüpfung der ersten Nukleotide ist ein instabiler Prozess, der wiederholt abgebrochen und von Neuem begonnen wird, was zur Freisetzung kurzer RNA-Transkripte führt. Bei einer Transkriptlänge von circa 25 Nukleotiden ist eine produktive Initiation der Transkription erreicht und die RNA-Polymerase II beginnt mit der Elongationsphase der Transkription (Shandilya und Roberts 2012).

Bevor der RNA-Polymerase-II-Komplex jedoch in die produktive Elongationsphase eintritt, durchläuft er zunächst verschiedene Anpassungen. Bei Metazoen wird dieser Prozess häufig von einem Pausieren der RNA-Polymerase II in der Promotor-nahen Region, 30 bis 60 Nukleotide stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts, begleitet und durch die Anlagerung des negativen Elongationsfaktors NELF (engl. *negative elongation factor*) und des Faktors DSIF (engl. *DRB-sensitivity-inducing factor*) vermittelt. In manchen Fällen können auch Nukleosomen zum Pausieren der RNA-Polymerase II in der Promotor-nahen Region beitragen. Das Pausieren der RNA-Polymerase II an dieser Stelle wird insbesondere zur Regulation der Transkriptionsrate und zum Anhängen einer *Cap*-Struktur aus Methylguanosin an das 5'-Ende von Protein-kodierenden Transkripten genutzt (Saunders et al. 2006; Adelman und Lis 2012; Jonkers und Lis 2015). Die *Cap*-Struktur wird für die Translation der meisten mRNAs benötigt und schützt sie vor dem Abbau durch Exonukleasen. Zudem fördert die *Cap*-Struktur Prozesse wie das *Splicing*, die Polyadenylierung und den Kernexport der mRNA (Cowling 2010). Die produktive Elongationsphase wird schließlich durch den positiven Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb) eingeleitet, der die carboxyterminale Domäne der RNA-Polymerase II und den Komplex aus NELF und DSIF phosphoryliert. Dies führt zur Dissoziation des Faktors NELF und verwandelt den Faktor DSIF in einen positiven Elongationsfaktor, der an die RNA-Polymerase II gebunden bleibt und die Elongation fördert (Saunders et al. 2006; Adelman und Lis 2012; Jonkers und Lis 2015). Auch während der produktiven Elongationsphase kann es zum Pausieren der RNA-Polymerase II an bestimmten DNA-Sequenzen kommen (Landick 2006; Darzacq et al. 2007).

Die Transkriptionseffizienz der RNA-Polymerase II wird unter anderem durch unterschiedliche Histonmodifikationen beeinflusst, die eine schwächere oder stärkere Bindung der DNA an die Nukleosomen hervorrufen und dadurch die Transkription fördern oder hemmen. Während der Elongation rekrutiert die RNA-Polymerase II verschiedene

Faktoren, zu denen beispielsweise Histon-Chaperone gehören. Diese Proteine ermöglichen das Vorankommen der RNA-Polymerase II durch Chromatin, indem sie die Interaktion der Nukleosomen mit der DNA lockern und hinter der RNA-Polymerase II den ursprünglichen Zustand wiederherstellen (Jonkers und Lis 2015). Zudem werden von der elongierenden RNA-Polymerase II *Splicing*-Faktoren rekrutiert, die am kotranskriptionellen *Splicing* des Prä-mRNA-Transkripts beteiligt sind (Shandilya und Roberts 2012; Merkhofer et al. 2014).

Die letzte Phase des Transkriptionszyklus umfasst die Termination der Transkription, die durch die Freisetzung des RNA-Transkripts und die Dissoziation der RNA-Polymerase II von der DNA gekennzeichnet ist. Bei der Synthese von Protein-kodierenden mRNA-Transkripten wird die Termination der Transkription durch ein Polyadenylierungssignal (PolyA-Signal) eingeleitet. Die Transkription des PolyA-Signals führt zu einer deutlichen Verlangsamung der Transkription und schließlich zum Pausieren der RNA-Polymerase II. Die meisten Protein-kodierenden Transkripte besitzen ein hoch konserviertes PolyA-Signal mit dem aus Adenin- und Uracil-Nukleotiden bestehenden Hexamer AAUAAA und einem stromabwärts davon gelegenen Guanin- und Uracil-reichen Element. Diese Elemente werden von den Faktoren CPSF (engl. *cleavage polyadenylation specificity factor*) und CstF (engl. *cleavage stimulation factor*) gebunden, die zusammen mit weiteren Faktoren die gezielte Spaltung des Prä-mRNA-Transkripts zwischen diesen Elementen hervorrufen. Anschließend wird das stromaufwärts der Spaltstelle gelegene Produkt durch die PolyA-Polymerase polyadenyliert und durchläuft weitere Reifungs- und Prozessierungsvorgänge, bevor es als reife mRNA für die Translation aus dem Zellkern exportiert wird. Das stromabwärts der Spaltstelle gelegene Produkt wird hingegen abgebaut. Bevor die RNA-Polymerase II von der DNA dissoziiert, wird sie an ihrer carboxyterminalen Domäne dephosphoryliert, sodass sie anschließend einen neuen Transkriptionszyklus beginnen kann (Nag et al. 2007; Proudfoot 2011; Shandilya und Roberts 2012).

Neben der Transkription Protein-kodierender mRNA-Transkripte, transkribiert die RNA-Polymerase II auch zahlreiche lange, nicht-kodierende RNAs (lncRNAs, engl. *long non-coding RNAs*), deren Funktionen größtenteils noch unbekannt sind. lncRNAs sind definitionsgemäß mehr als 200 Nukleotide lang und kodieren nicht für Proteine. Viele von ihnen weisen jedoch Ähnlichkeiten zu mRNAs auf und werden an ihrem 5'-Ende mit einer *Cap*-Struktur verknüpft, gespleißt und am 3'-Ende polyadenyliert. Die auf diese Weise prozessierten lncRNAs sind biochemisch oft nicht von mRNAs zu unterscheiden. Tendenziell sind sie jedoch eher kürzer als mRNAs, besitzen weniger aber dafür längere Exons, werden weniger stark exprimiert und weisen eine geringere Konservierung ihrer Primärsequenz auf. Die Definition der lncRNAs fasst jedoch viele unterschiedliche RNAs zu einer Gruppe

zusammen. Daher gibt es auch zahlreiche Beispiele von lncRNAs, die auf sehr unterschiedliche Weise prozessiert werden (Shandilya und Roberts 2012; Quinn und Chang 2015).

1.2 Aufbau eukaryotischer Promotoren

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben, erfolgt die Initiation der Transkription an spezifischen DNA-Sequenzen, die als Promotoren bezeichnet werden. Der Kernpromotor (engl. *core promoter*) ist Teil des Promotors und umfasst alle Sequenzelemente, die von der basalen Transkriptionsmaschinerie, die schließlich den Prä-Initiationskomplex bildet, gebunden werden. Durch den Kernpromotor wird der Startpunkt und die Richtung der Transkription festgelegt (Maston et al. 2006).

Die Sequenzelemente des RNA-Polymerase-II-Kernpromotors können stromaufwärts oder stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts angeordnet sein. Bekannte Elemente des Kernpromotors sind die TATA-Box, das Transkriptionsfaktor-IIIB-Erkennungselement (BRE, engl. *TFIIB recognition element*), das Initiator-Element und die Elemente DPE (engl. *downstream promoter element*), DCE (engl. *downstream core element*) und MTE (engl. *motif ten element*) (Juven-Gershon und Kadonaga 2010; Sainsbury et al. 2015). Die TATA-Box und das BRE-Sequenzelement sind zusammen mit ihren Proteinfaktoren TBP und TFIIB von den Archaeen bis hin zum Menschen hoch konserviert und gehören damit zu den ältesten Sequenzelementen des Kernpromotors (Juven-Gershon et al. 2008). Das Initiator-Element überlappt mit dem Transkriptionsstartpunkt und wird, wie auch vermutlich die Elemente DPE, DCE und MTE, von bestimmten TAFs erkannt (Sainsbury et al. 2015).

Die TATA-Box und andere Kernpromotor-Elemente wie BRE, DPE und DCE werden mit einer fokussierten Transkriptionsinitiation in Verbindung gebracht. Der Kernpromotor besitzt hierbei entweder nur einen Transkriptionsstartpunkt oder eine Ansammlung von Transkriptionsstartpunkten, die in einem kleinen definierten Bereich lokalisiert sind. Kernpromotoren, deren Transkriptionsstartpunkte über circa 50 bis 100 Nukleotide verteilt sind, weisen tendenziell eher keine dieser Elemente auf. Bei Vertebraten befinden sich solche Kernpromotoren meist in Regionen mit einem vergleichsweise hohen Anteil an CpG-Dinukleotiden (Dinukleotid aus Cytosin gefolgt von Guanin in 5'-3'-Orientierung), den sogenannten CpG-Inseln (Juven-Gershon et al. 2008; Blackledge und Klose 2011; Deaton und Bird 2011).

CpG-Dinukleotide sind in den meisten Genomen von Vertebraten insgesamt unterrepräsentiert, da sie an Position fünf der Cytosinbase durch DNA-Methyltransferasen methyliert werden können und aus dem daraus resultierenden 5-Methylcytosin durch

Desaminierung die Base Thymin entstehen kann. Es gibt jedoch auch Bereiche im Genom der Vertebraten, die ein erhöhtes Vorkommen an CpG-Dinukleotiden aufweisen (Bird 1980; Smale und Kadonaga 2003). Diese CpG-Inseln umfassen mindestens 500 Basenpaare, besitzen einen Gehalt an Guanin- und Cytosin-Nukleotiden von 55 Prozent oder mehr und das Verhältnis von vorhandenen zu erwarteten CpG-Dinukleotiden liegt bei mindestens 0,65 (Takai und Jones 2002).

Etwa 70 Prozent der annotierten Promotoren von Vertebraten sind mit einer CpG-Insel assoziiert (Saxonov et al. 2006; Deaton und Bird 2011). CpG-Inseln liegen meist unmethyliert vor. Manche von ihnen werden während der normalen Entwicklung jedoch stark methyliert, was zur stabilen Inaktivierung des assoziierten Promotors führt. Diese Promotor-Inaktivierung könnte zum einen dadurch hervorgerufen werden, dass die Transkriptionsfaktoren aufgrund der DNA-Methylierung nicht mehr an den Promotor binden können. Zum anderen könnte die Inaktivierung des Promotors aber auch durch Proteine mit einer Methyl-CpG-Bindedomäne ausgelöst werden, die Chromatin-modifizierende Faktoren zur methylierten DNA rekrutieren und durch repressive Histonmodifikationen die Bindung der Transkriptionsmaschinerie verhindern (Deaton und Bird 2011). Die Trimethylierung des Lysins an Position 27 von Histon H3 (H3K27me3) führt beispielsweise zu einem repressiven Chromatinzustand, der die Transkription am Promotor inhibiert und daher charakteristisch für inaktive Promotoren ist. Im Gegensatz dazu weisen Promotorregionen von aktiven Genen allgemein acetylierte Histone und an Position vier des Lysins methylierte H3-Histone auf. Die Trimethylierung des Lysins an Position vier von Histon H3 (H3K4me3) führt beispielsweise zu einer offenen Chromatinumgebung, die die Transkription ermöglicht (Barski et al. 2007; Shandilya und Roberts 2012).

Für eine effiziente Transkription sind neben dem Kernpromotor weitere Sequenzelemente erforderlich, die von regulatorischen Faktoren gebunden werden und die Transkription fördern. Zu diesen Sequenzelementen gehören die sogenannten *Enhancer*, die im aktiven Zustand die charakteristischen Histonmodifikationen H3K27ac (Acetylierung des Lysins an Position 27 des Histons H3) sowie H3K4me1 (Monomethylierung des Lysins an Position vier des Histons H3) aufweisen und die Transkription fördern (Maston et al. 2006; Creighton et al. 2010). Weitere regulatorische Sequenzelemente sind beispielsweise *Silencer*, Isolatoren (engl. *insulators*) oder Locus-Kontrollregionen (engl. *locus control region*) (Maston et al. 2006).

1.3 Transkriptionelle Interferenz

Sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten besteht die primäre Funktion der Transkription in der Produktion von RNA-Transkripten. Allerdings werden immer mehr Beispiele bekannt, bei denen die Transkription zusätzlich dazu auch eine regulatorische Funktion einnimmt, wobei ein Transkriptionsprozess einen anderen direkt hemmt (Palmer et al. 2011). Obwohl wahrscheinlich 90 Prozent des menschlichen Genoms transkribiert werden, kodieren weniger als zwei Prozent des Genoms für Proteine (Human Genome Sequencing Consortium 2004; Birney et al. 2007; Wilusz et al. 2009). Zudem überlappen vermutlich 40 Prozent der gebildeten Transkripte mit anderen Transkripten (Birney et al. 2007; Palmer et al. 2011). Diese überlappende Transkription kann zur direkten Unterdrückung eines Transkriptionsprozesses durch den anderen *in cis* führen, was als transkriptionelle Interferenz (TI) bezeichnet wird (Shearwin et al. 2005). Im Gegensatz zu anderen Regulationsmechanismen der Genexpression, ist für die TI nicht die Sequenz der transkribierten RNA, sondern vielmehr der Prozess der Transkription entscheidend, weshalb vor allem auch nicht-kodierende RNAs (ncRNAs, engl. *non-coding RNAs*) an diesem Prozess beteiligt sein können (Mazo et al. 2007). Viele ncRNAs überlappen mit Promotoren oder regulatorischen Elementen benachbarter Gene und könnten daher, statt eine funktionale RNA zu bilden, an der Regulation der Genexpression durch TI beteiligt sein (Palmer et al. 2011).

TI kann durch unterschiedliche Promotoranordnungen hervorgerufen werden. Konvergente Promotoren sind einander zugewandt angeordnet, sodass die gebildeten Transkripte aufeinander zulaufen (Abbildung 1A). TI kann bei dieser Anordnung der Promotoren nur dann hervorgerufen werden, wenn die Transkripte zumindest teilweise miteinander überlappen (Callen et al. 2004; Shearwin et al. 2005). Verläuft die von zwei Promotoren ausgehende Transkription in die gleiche Richtung, so handelt es sich um Tandem-Promotoren (Abbildung 1B). Bei dieser Promotoranordnung müssen die Transkripte für den Prozess der TI nicht zwingend miteinander überlappen. Es kann auch eine ausschließlich mit dem stromabwärts gelegenen Promotor überlappende Transkription für die TI ausreichend sein (Martens et al. 2004; Shearwin et al. 2005). Divergierende Promotoren sind in entgegengesetzter Richtung angeordnet, sodass die Transkripte nicht miteinander überlappen können (Abbildung 1C). Für den Prozess der TI müssen sich daher die Bindestellen für die Transkriptionsmaschinerie der beteiligten Promotoren zumindest teilweise überschneiden (Wang et al. 1998; Shearwin et al. 2005).

Meist ist die TI ein asymmetrischer Prozess, bei dem ein starker Promotor die Aktivität eines schwachen Promotors reduziert (Shearwin et al. 2005).

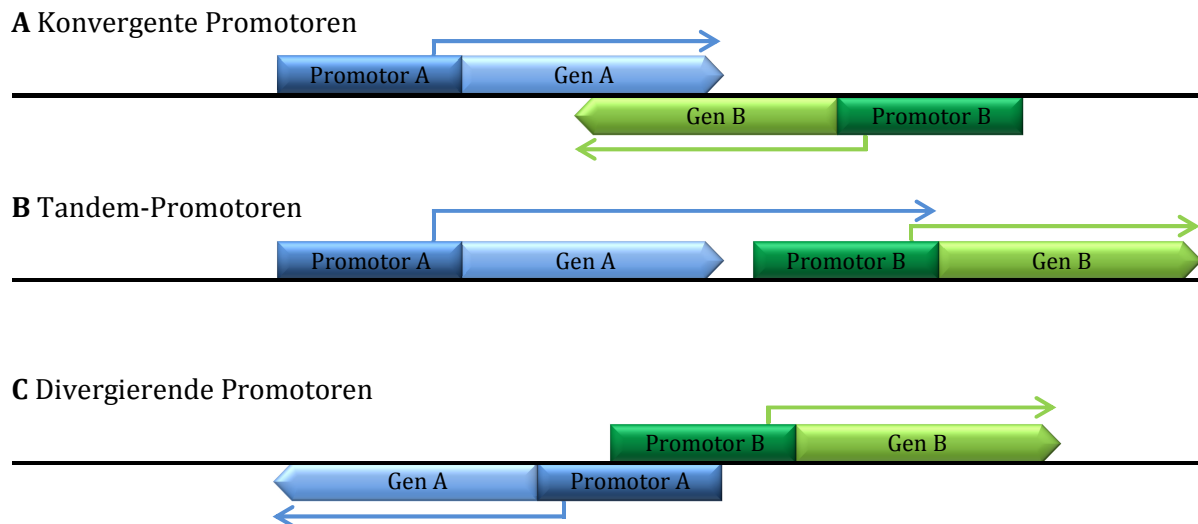


Abbildung 1: Promotoranordnungen, die die transkriptionelle Interferenz ermöglichen. TI kann durch unterschiedliche Anordnungen von Promotoren hervorgerufen werden: **A** konvergente Promotoren, **B** Tandem-Promotoren oder **C** divergierende Promotoren. In dunkelblau und dunkelgrün sind jeweils die Promotoren, in hellblau und hellgrün die dazugehörigen Gene dargestellt. Die entsprechende Transkriptionsrichtung ist mit Pfeilen angegeben. Eigene Darstellung nach Shearwin et al. 2005.

Die Regulation der Genexpression durch TI konnte sowohl in Viren, Mikroben als auch Metazoen für eine große Vielfalt an biologischen Prozessen nachgewiesen werden. Es ist demnach davon auszugehen, dass TI nahezu ubiquitär in lebenden Organismen vorkommt (Palmer et al. 2011). Evolutionär könnte dieser Regulationsmechanismus parallel zu der von Transkriptionsfaktoren abhängigen Regulation der Genexpression entstanden sein. Denkbar ist jedoch auch, dass zunächst eine Regulation durch Interaktion der RNA-Polymerasen existierte und sich der Faktor-abhängige Regulationsmechanismus erst im Laufe der Evolution entwickelte (Nasser et al. 2002; Shearwin et al. 2005).

Für extrachromosomale Elemente wie Plasmide, Bakteriophagen, Transposons oder Insertionssequenzen sind viele Beispiele für die Regulation der Genexpression durch TI bekannt (Simons et al. 1983; Jagura-Burdzy und Thomas 1997; Kimura und Yamaguchi 1998; Dodd und Egan 2002; Shearwin et al. 2005). Aber auch für chromosomale DNA von Bakterien und Hefen wurden verschiedene Beispiele von TI beschrieben (Nasser et al. 2002; Martens et al. 2004; Shearwin et al. 2005). Weniger Beispiele sind für höhere Eukaryoten bekannt (Shearwin et al. 2005; Latos et al. 2012; Meng et al. 2013). Allerdings ermöglicht die Introngröße bei höheren Eukaryoten eine Anordnung von Genen in Introns anderer Gene und birgt daher ein großes Potenzial für eine Regulation dieser Gene durch TI (Portin 2002; Shearwin et al. 2005). Des Weiteren wurde mithilfe von Transkriptom-Analysen in verschiedenen Organismen wie beispielsweise *Arabidopsis*, *Drosophila*, der Maus und dem Menschen ein hohes Vorkommen an ncRNAs und *Antisense*-Transkripten nachgewiesen, die

möglicherweise eine Rolle bei der Regulation der Genexpression durch TI spielen könnten (Okazaki et al. 2002; Yamada et al. 2003; Yelin et al. 2003; Lavorgna et al. 2004; Stolc et al. 2004; Shearwin et al. 2005).

Bei Säugetieren ist TI auch an einem epigenetischen Prozess beteiligt, der als genomische Prägung oder genomisches *Imprinting* (engl. *genomic imprinting*) bezeichnet wird und eine elternspezifische monoallelische Genexpression bewirkt. Hierbei spielen vor allem lncRNAs eine Rolle, die in vielen geprägten Genregionen nachgewiesen werden konnten (Latos et al. 2012; Meng et al. 2013; Barlow und Bartolomei 2014).

Bei Säugetieren sind circa 100 elternspezifisch exprimierte Gene bekannt, zu denen sowohl Protein-kodierende Gene als auch Gene von ncRNAs zählen (Dindot et al. 2009; Bartolomei und Ferguson-Smith 2011). Die Expression dieser Gene wird durch differenziell methylierte Genregionen reguliert. Diese Regionen werden durch differenzielle DNA-Methylierung und Histonmodifikationen bereits in der mütterlichen bzw. väterlichen Keimbahn markiert und diese Markierungen nach der Befruchtung bei allen nachfolgenden Teilungen der diploiden Zellen aufrecht erhalten (Reik und Walter 2001; Idarababdullah et al. 2008). Die differenzielle DNA-Methylierung erfolgt an CpG-reichen, sogenannten *Imprinting*-Kontrollregionen (ICR, engl. *imprinting control region*) und reguliert auf diese Weise die Genexpression der geprägten Genregion *in cis*. Geprägte Genregionen umfassen oft mehrere Gene, die in Gruppen angeordnet sind und von einer ICR reguliert werden. Maternal methylierte ICRs befinden sich in der Regel in intragenischen Regionen und beinhalten Promotoren, während paternal methylierte ICRs allgemein in intergenischen Regionen lokalisiert sind (Bartolomei und Ferguson-Smith 2011).

Die Etablierung der differenziellen DNA-Methylierung in der weiblichen Keimbahn ist abhängig von der *de novo* DNA-Methyltransferase DNMT3A und dem nicht-enzymatischen Kofaktor DNMT3L. Wie jedoch bestimmte Sequenzen in der Keimbahn spezifisch für die DNA-Methylierung durch DNMT3A und DNMT3L ausgewählt werden, ist noch weitgehend unbekannt. Eine mit der ICR überlappende Transkription scheint jedoch entscheidend für die Spezifität der *de novo* DNA-Methylierung in Oozyten zu sein (Chotalia et al. 2009; Horsthemke 2010; Lewis et al. 2015). Da sich maternal methylierte ICRs in Promotorregionen befinden, ist eine Beteiligung der TI an der Etablierung der *de novo* DNA-Methylierung möglich.

Denkbar ist, dass die mit der ICR überlappende Transkription Histonmodifikationen hervorruft, die eine Interaktion mit DNMT3A und DNMT3L fördern und so zur Methylierung der ICR führen. Andere transkribierte Regionen könnten hingegen vor DNA-Methylierung geschützt werden. In somatischen Zellen binden Proteine mit einer CXXC-Domäne spezifisch

an unmethylierte CpG-Dinukleotide. Sie könnten sich daher auch in Oozyten an einen Teil der intragenischen CpG-Inseln anlagern und diese vor DNA-Methylierung schützen (Kelsey und Feil 2012; Lewis et al. 2015).

Deutlich weniger ist über die Etablierung der differenziellen DNA-Methylierung in der väterlichen Keimbahn bekannt. In männlichen Gameten konnte in differenziell methylierten Regionen auch eine starke Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden, die vorwiegend auf einem DNA-Strang erfolgte und sich zur gleichen Zeit wie die Etablierung der DNA-Methylierung ereignete. Die Transkription überlappte dabei ebenfalls mit der Sequenz der differenziell methylierten Region. In welcher Weise diese überlappende Transkription eine Rolle bei der Etablierung der *de novo* DNA-Methylierung in der väterlichen Keimbahn spielt, ist bisher jedoch nicht bekannt (Henckel et al. 2012; Barlow und Bartolomei 2014).

1.4 TI durch konvergente Promotoranordnung

1.4.1 Unterdrückung der paternalen *UBE3A*-Transkription in Neuronen

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, ist die TI an der elternspezifischen monoallelischen Genexpression beteiligt. Ein konserviertes, geprägtes Gen, dessen Regulation durch überlappende Transkription erfolgt, ist *Ube3a* (Meng et al. 2012). Sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus, wird *Ube3a* in Neuronen ausschließlich vom maternal ererbten Allel exprimiert, während die Expression in anderen Geweben biallelisch erfolgt (Albrecht et al. 1997; Rougeulle et al. 1997; Vu und Hoffman 1997; Chamberlain und Lalande 2010). Die monoallelische *Ube3a*-Expression konnte beispielsweise in zerebralen Purkinjezellen, in Neuronen des Hippocampus und in olfaktorischen Mitralzellen der Maus nachgewiesen werden (Albrecht et al. 1997; Meng et al. 2013).

Das *UBE3A*-Gen (engl. *ubiquitin protein ligase E3A*) kodiert für das Protein E6-AP (engl. *E6-associated protein*), das zu den E3-Ubiquitin-Ligasen gehört und damit eine wichtige Rolle beim Proteinabbau spielt. E3-Ubiquitin-Ligasen katalysieren die Ligation von Ubiquitin an Lysinreste von Proteinen, die für den Abbau im Proteasom bestimmt sind. Es wurden drei verschiedene Isoformen des Proteins E6-AP identifiziert, die durch alternatives Spleißen des *UBE3A*-Transkripts entstehen (Scheffner et al. 1993; Yamamoto et al. 1997; Martinez-Noel et al. 2012).

Das Gen *UBE3A* ist in der humanen Genregion 15q11q13 und der murinen Chromosomenregion 7C lokalisiert, die zwischen Mensch und Maus konserviert ist. Beide Genregionen weisen eine Gruppe von Genen auf, deren Expression durch eine ICR *in cis* reguliert wird. Mit Ausnahme von *UBE3A*, werden die geprägten Gene in dieser Region vom paternal ererbten Allel exprimiert (Greally et al. 1999; Nicholls und Knepper 2001).

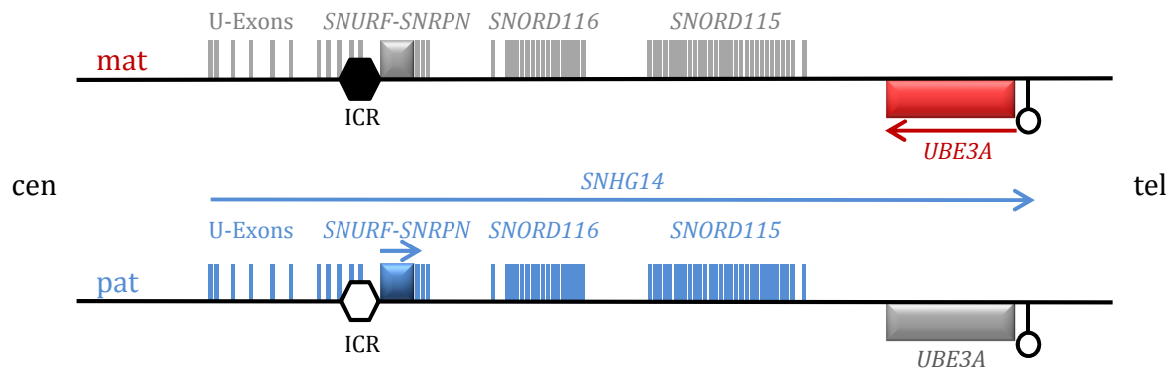


Abbildung 2: Ausschnitt aus der humanen Chromosomenregion 15q11q13 mit der in Neuronen vorherrschenden Genexpression. Die Transkriptionseinheit des paternal (pat) exprimierten *SNURF-SNRPN*-Gens umfasst mehrere alternative Exons, die stromaufwärts von Exon 1 lokalisiert sind (U-Exons). *SNHG14* ist eine paternal exprimierte lncRNA, die mit dem *UBE3A*-Gen überlappt und aus deren Intronregionen die snoRNAs *SNORD116* und *SNORD115* prozessiert werden. Paternal exprimierte Gene sind in blau, das maternal (mat) exprimierte Gen *UBE3A* in rot und inaktive Gene in grau dargestellt. Die Pfeile geben die jeweilige Transkriptionsrichtung der aktiven Gene an. Auf dem maternalen Allel liegt die ICR methyliert (schwarzes Hexagon), auf dem paternalen Allel unmethyliert (weißes Hexagon) vor. Der *UBE3A*-Promotor ist hingegen sowohl maternal als auch paternal unmethyliert (leere Kreise). Die Orientierung der Gene zum Centromer (cen) und Telomer (tel) ist entsprechend angegeben.

Die ICR umfasst Exon 1 des *SNURF-SNRPN*-Gens (engl. *SNRPN upstream reading frame - small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*) sowie eine stromaufwärts davon gelegene Region und liegt auf dem maternalen Chromosom methyliert vor. Beim Menschen ist diese ICR zweigeteilt und setzt sich aus dem AS- bzw. PWS-SRO (engl. *Angelman syndrome / Prader-Willi syndrome smallest region of overlap*) zusammen. Die Bezeichnung geht auf die Eingrenzung dieser beiden Bereiche durch überlappende Deletionen von Patienten mit *Imprinting*-Defekten zurück (Buiting et al. 1999; Ohta et al. 1999a; Ohta et al. 1999b; Buiting et al. 2003; Horsthemke und Wagstaff 2008). Im Bereich des AS-SRO befindet sich ein Oozyten-spezifischer Promotor, dessen Transkripte den PWS-SRO überqueren und so vermutlich zu dessen Inaktivierung durch DNA-Methylierung auf dem maternalen Allel führen. Der PWS-SRO ist daher nur auf dem paternalen Allel aktiv und kontrolliert dort die Genexpression (Dittrich et al. 1996; Lewis et al. 2015).

Auch bei der Maus wurde ein Bereich identifiziert, der die Funktion des humanen AS-SRO einnimmt, dessen Sequenz jedoch nicht konserviert ist. Durch eine in diesem Bereich initiierte Transkription wird ebenfalls die Methylierung des PWS-IC (engl. *Prader-Willi syndrome imprinting center*) auf dem maternalen Allel gesteuert (Smith et al. 2011).

Im Bereich der ICR ist das *SNURF-SNRPN*-Gen lokalisiert, welches mehrere alternative, stromaufwärts von Exon 1 liegende, Exons (U-Exons, engl. *upstream exons*) umfasst. Stromabwärts der ICR liegen zwei Gruppen von snoRNA-Genen (engl. *small nucleolar RNA*), *SNORD116* und *SNORD115*, die aus Intronregionen einer lncRNA namens *SNHG14* (engl.

small nucleolar RNA host gene 14) prozessiert werden und das *UBE3A*-Gen (Abbildung 2) (Runte et al. 2001; Wawrzik et al. 2009; Lewis et al. 2015).

Die maternale Expression des *SNURF-SNRPN*-Gens, der lncRNA *SNHG14* und damit auch der snoRNA-Gene *SNORD116* und *SNORD115* wird durch die Methylierung der ICR unterdrückt. Zudem erfolgt die Expression von *SNORD115* ausschließlich in Neuronen, da in diesen Zellen ein deutlich längeres *SNHG14*-Transkript gebildet wird, woraus diese snoRNAs prozessiert werden. Die Transkription von *SNHG14* wird stromaufwärts der ICR initiiert und überlappt in neuronalen Zellen mit dem gesamten *UBE3A*-Gen in konvergenter Richtung¹. Mit dieser überlappenden Transkription korreliert die monoallelische Genexpression von *UBE3A*. Es wird vermutet, dass in nicht-neuronalen Zellen aufgrund eines Begrenzungselements zwischen *SNORD116* und *SNORD115* ein kürzeres *SNHG14*-Transkript gebildet und hierdurch die überlappende Transkription mit dem *UBE3A*-Gen und dessen Promotor verhindert wird (Runte et al. 2001; Runte et al. 2004; Martins-Taylor et al. 2014).

Studien in der Maus zeigten, dass die monoallelische *Ube3a*-Expression in neuronalen Zellen durch überlappende Transkription der lncRNA *Snhg14* mit dem *Ube3a*-Gen hervorgerufen wird (Chamberlain und Brannan 2001; Landers et al. 2004; Numata et al. 2011; Meng et al. 2012). Durch Integration einer transkriptionellen Stoppkassette stromabwärts des *Ube3a*-Gens wurde die Transkription von *Snhg14* verkürzt und so die konvergent überlappende Transkription von *Snhg14* mit *Ube3a* unterbunden. Dies resultierte in der Aktivierung der paternalen *Ube3a*-Genexpression in neuronalen Zellen, wobei das Expressionsmuster des paternalen *Ube3a*-Gens sehr ähnlich zu dem des maternalen *Ube3a*-Gens war. Das durch paternale *Ube3a*-Expression gebildete E6-AP-Protein konnte beispielsweise im Neocortex, Hippocampus und Cerebellum transgener Mäuse nachgewiesen werden (Meng et al. 2012; Meng et al. 2013).

Der Promotor des maternalen als auch des paternalen *Ube3a*-Gens liegt in neuronalen Zellen unmethyliert vor und weist die Histonmodifikation H3K4me3 auf, welche aktive Promotoren kennzeichnet (Xie et al. 2012; Meng et al. 2013). Daher wurde eine mögliche Aktivität des paternalen *Ube3a*-Promotors angenommen. Schließlich wurde nachgewiesen, dass das paternale *Ube3a*-Gen am 5'-Ende in ähnlicher Höhe wie das maternale *Ube3a*-Gen transkribiert wird. Die paternalen *Ube3a*-Transkripte werden jedoch in Intron 4 von *Ube3a* vorzeitig terminiert, weshalb daraus keine reifen mRNA-Transkripte prozessiert und somit keine Proteine synthetisiert werden können (Numata et al. 2011; Meng et al. 2013).

¹ Die *SNHG14*-Transkripte, die mit dem *UBE3A*-Gen überlappen, sind auch unter dem Namen *UBE3A-ATS* (engl. *UBE3A antisense transcript*) bekannt. Gemäß den Empfehlungen des HGNC (engl. *HUGO Gene Nomenclature Committee*) werden in der vorliegenden Arbeit sowohl die mit dem *UBE3A*-Gen überlappenden, als auch die nicht-überlappenden Transkripte mit dem Namen *SNHG14* bezeichnet.

Es ist denkbar, dass die konvergierenden RNA-Polymerase-Komplexe von *Ube3a* und *Snhg14* in Intron 4 des paternalen *Ube3a*-Gens miteinander kollidieren und hierdurch eine Translokation der elongierenden RNA-Polymerasen von *Ube3a* hervorgerufen wird. Dies könnte den vorzeitigen Abbruch der Transkriptionselongation des paternalen *Ube3a*-Transkripts erklären. Es handelt sich dabei um eine Modellvorstellung der TI (Abbildung 3) (Meng et al. 2013).

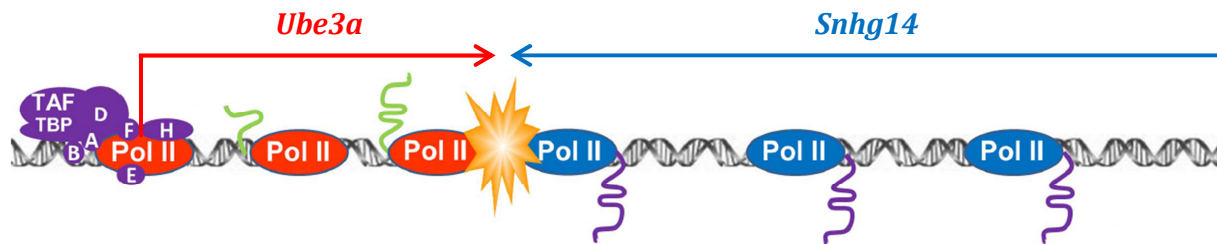


Abbildung 3: Modellvorstellung der kollidierenden RNA-Polymerase-Komplexe am paternalen *Ube3a*-Locus der Maus. Das Modell zeigt einen möglichen Regulationsmechanismus der monoallelischen *Ube3a*-Expression in neuronalen Zellen. Nach der Initiation der Transkription am paternalen *Ube3a*- (rot) und *Snhg14*-Promotor (blau) kollidieren die RNA-Polymerase-Komplexe während der Transkriptionselongation in Intron 4 des *Ube3a*-Gens. Dies führt zum vorzeitigen Abbruch des paternalen *Ube3a*-Transkripts. Die Pfeile geben die konvergente Transkriptionsrichtung von *Ube3a* und *Snhg14* an. Abbildung angepasst nach Meng et al. 2013.

Die Erforschung der Regulation der *UBE3A*-Expression trägt zum besseren Verständnis einer *Imprinting*-Erkrankung des Menschen bei, dem sogenannten Angelman-Syndrom. Diese Erkrankung wird durch einen Funktionsverlust des maternalen *UBE3A*-Gens verursacht. Da in Neuronen die Transkription des paternalen *UBE3A*-Gens unterdrückt wird, kann bei einem Funktionsverlust des maternalen *UBE3A*-Gens in diesen Zellen kein funktionales E6-AP-Protein gebildet werden (Kishino et al. 1997; Matsuura et al. 1997).

Das daraus resultierende Angelman-Syndrom ist eine seltene neurogenetische Erkrankung, welche erstmals 1965 von dem britischen Arzt Dr. Harry Angelman beschrieben wurde. Sie tritt mit einer Häufigkeit von circa 1:12.000 bis 1:20.000 auf und ist durch schwere Intelligenzminderung, fehlende bzw. sehr eingeschränkte Sprachentwicklung, Ataxie, epileptische Anfälle und Schlafstörungen charakterisiert. Typische Verhaltensmerkmale sind zudem häufiges, unbegründetes Lachen und ein freundliches Wesen der Patienten (Williams et al. 2006; Buiting 2010; Dagli et al. 2012).

Die häufigste Ursache des Angelman-Syndroms ist in circa 70 Prozent der Fälle eine große maternale *de novo* Deletion in der Chromosomenregion 15q11q13. Diese Deletion schließt neben *UBE3A* auch andere geprägte Gene in dieser Genregion ein (Knoll et al. 1989; Buiting 2010). Bei circa zehn Prozent der Patienten wird die Erkrankung durch Mutationen des

maternalen *UBE3A*-Gens verursacht. Dadurch wurde *UBE3A* als das Angelman-Syndrom-Gen identifiziert (Kishino et al. 1997; Matsuura et al. 1997; Buiting 2010). In zwei bis vier Prozent der Fälle ist eine Störung der genomischen Prägung, ein sogenannter *Imprinting*-Defekt, in der Region 15q11q13 die Ursache für die Erkrankung. Dabei fehlt die Methylierung der ICR auf dem maternalen Chromosom (Buiting et al. 1998; Buiting 2010). Mit zwei bis fünf Prozent ist eine weitere seltene Ursache des Angelman-Syndroms eine paternale uniparentale Disomie 15q11q13, bei der die Patienten zwei paternale Chromosomenregionen ererbt haben (Malcolm et al. 1991; Buiting 2010). Während Patienten mit einer paternalen uniparentalen Disomie oder einem *Imprinting*-Defekt in der Regel einen schwächeren Phänotyp aufweisen, sind Patienten mit Deletionen meist stärker betroffen (Gentile et al. 2010; Tan et al. 2011; Margolis et al. 2015).

1.4.2 Unterdrückung der *HBA2*-Transkription in Patienten mit α -Thalassämie

Die Studie eines Patienten mit α -Thalassämie zeigte, dass eine überlappende Transkription auch zur monoallelischen Expression von Genen führen kann, die nicht der genomischen Prägung unterliegen und dass hierdurch genetische Erkrankungen hervorgerufen werden können (Tufarelli et al. 2003).

Das im erwachsenen Menschen vorherrschende Hämoglobin A (HbA) ist ein Komplex aus vier Polypeptidketten, zwei vom α - und zwei vom β -Globintyp, und vier assoziierten Hämgruppen, die reversibel jeweils ein Sauerstoffmolekül binden können (Schechter 2008). Die Gene, welche für die α -Globinketten kodieren, sind in der Nähe des Telomers in der chromosomalen Region 16p13.3 lokalisiert und werden entwicklungspezifisch in erythroiden Zellen exprimiert. Die Genregion beinhaltet die α -Globingene *HBM* und *HBQ1*, welche nur eine untergeordnete Rolle bei der α -Globin-Produktion spielen, das im Embryo exprimierte Gen *HBZ*, zwei Pseudogene namens *HBAP1* und *HBZP1* sowie die beiden α -Globingene *HBA1* und *HBA2* (Ribeiro und Sonati 2008).

Die vererbte Hämoglobin-Erkrankung α -Thalassämie wird durch den Funktionsverlust eines oder mehrerer α -Globin-Gene verursacht und führt zu einer quantitativen Reduktion der α -Globinketten (Higgs 1993; Ribeiro und Sonati 2008). Studien eines α -Thalassämie-Patienten zeigten, dass eine konvergent überlappende Transkription mit der CpG-Insel des *HBA2*-Gens (engl. *hemoglobin subunit alpha 2*) zur Unterdrückung der Genexpression von *HBA2* und zur Methylierung der CpG-Insel führen kann. Der betroffene Patient weist ein strukturell intaktes *HBA2*-Gen auf, dessen Expression stabil unterdrückt wird. Die Promotorregion dieses Gens liegt in einer CpG-Insel, die weit in den offenen Leserahmen des Gens hineinreicht und bei diesem Patienten im Laufe der Entwicklung auf

einem Allel stark methyliert wurde. Auf diesem Allel sind die α -Globin-Gene *HBA1* und *HBQ1* deletiert, sodass sich das Gen *LUC7L* in direkter Nachbarschaft zum *HBA2*-Gen befindet. Die letzten drei Exons, inklusive des Terminationssignals von *LUC7L*, sind ebenfalls von der Deletion betroffen. Bei Menschen, die diese Deletion nicht aufweisen, liegt die Promotorregion von *HBA2* auf beiden Allelen unmethyliert vor (Barbour et al. 2000; Tufarelli et al. 2003).

Das *LUC7L*-Gen wird in vielen Geweben exprimiert. Dort führt die Deletion zu einem verlängerten *LUC7L*-Transkript, das in konvergenter Richtung das *HBA2*-Gen und dessen CpG-Insel überlappt (Abbildung 4) (Tufarelli et al. 2003).

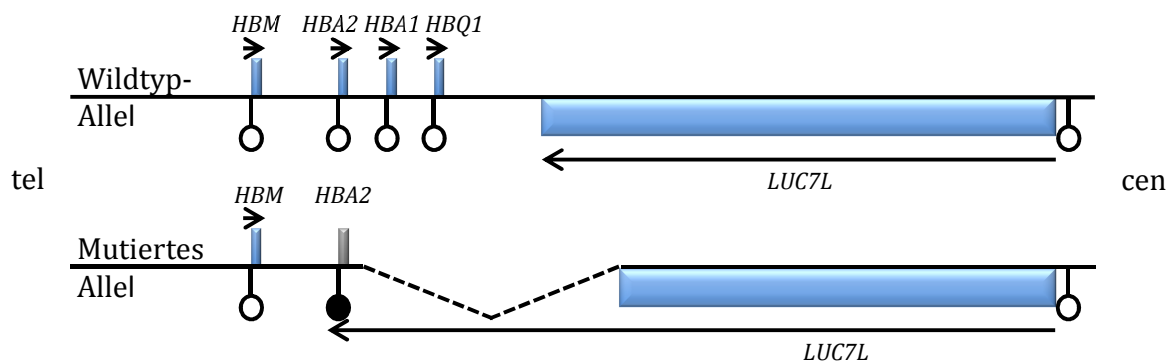


Abbildung 4: Übersicht über die Allel-spezifische Inaktivierung der *HBA2*-Transkription bei einem α -Thalassämie-Patienten beschrieben von Tufarelli et al. 2003. Vom Wildtyp-Allel wird das *HBA2*-Gen in erythroiden Zellen normal exprimiert (blau) und weist, wie alle Gene in dieser Region, eine unmethylierte CpG-reiche Promotorregion (leerer Kreis) auf. Auf dem mutierten Allel sind die Gene *HBA1* und *HBQ1* sowie das 3'-Ende inklusive des Terminationssignals des Gens *LUC7L* deletiert, weshalb ein verlängertes *LUC7L*-Transkript gebildet wird, das mit der CpG-Insel des *HBA2*-Gens in konvergenter Richtung überlappt. Dies führt zur Inaktivierung der *HBA2*-Genexpression (grau) und zur Methylierung der CpG-reichen Promotorregion (ausgefüllter Kreis). Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der Gene an, während die Orientierung der Genregion zum Telomer und Centromer mit tel und cen gekennzeichnet ist.

Mithilfe eines transgenen Mausmodells, welches die von der Deletion betroffene Genregion des Patienten imitiert, konnte gezeigt werden, dass die unterdrückte Expression des *HBA2*-Gens in diesem Patienten durch die konvergent überlappende Transkription des verlängerten *LUC7L*-Transkripts hervorgerufen wird. Zudem konnte anhand von murinen transgenen embryonalen Stammzellen, welche in Embryoid-Körper (EB, engl. *embryoid bodies*) differenziert wurden, nachgewiesen werden, dass die CpG-Insel des *HBA2*-Gens erst im Laufe der Entwicklung methyliert wird. Während der *HBA2*-Promotor in den embryonalen Stammzellen, ebenso wie in der Keimbahn des Patienten, noch unmethyliert vorlag, wurde er während der Differenzierung in EBs spezifisch auf dem Allel mit der Deletion und der damit verbundenen überlappenden Transkription methyliert. Dass diese

DNA-Methylierung nicht durch die Inaktivierung des Promotors hervorgerufen wurde, konnte zudem durch Deletion der TATA-Box des *HBA2*-Promotors ausgeschlossen werden. Diese Deletion resultierte in einer Inaktivierung der Transkription des *HBA2*-Gens, führte jedoch nicht zur Methylierung des *HBA2*-Promotors (Tufarelli et al. 2003).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Sequenz des überlappenden Transkripts keinen Einfluss auf die Methylierung der CpG-Insel von *HBA2* hat. Durch den Austausch des gesamten *LUC7L*-Fragments mit der Sequenz des humanen Ubiquitin-C-Promotors konnte der gleiche repressive Effekt auf den *HBA2*-Promotor beobachtet werden. Das Konstrukt produzierte ebenfalls RNA-Transkripte, die mit dem *HBA2*-Gen und dessen Promotor überlappten und zur Methylierung des *HBA2*-Promotors führten (Tufarelli et al. 2003).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die DNA-Methylierung des *HBA2*-Promotors in dem betroffenen Patienten durch die konvergent überlappende Transkription mit der CpG-Insel von *HBA2* hervorgerufen wird. Auf welche Weise die überlappende Transkription diese *de novo* DNA-Methylierung genau hervorruft, ist jedoch noch nicht bekannt (Tufarelli et al. 2003).

1.5 TI durch Tandem-Promotoranordnung: Unterdrückung der *MSH2*-Transkription in Patienten mit Lynch-Syndrom

Auch eine von Tandem-Promotoren ausgehende überlappende Transkription kann zur TI führen. Dies konnte bei Patienten mit dem sogenannten Lynch-Syndrom beobachtet werden. Diese Patienten besitzen ein vererbtes, erhöhtes Risiko an einem kolorektalen Karzinom, einem Endometriumkarzinom oder anderen Tumoren zu erkranken. Mutationen in der parental Keimbahn führen zum Funktionsverlust der DNA-*Mismatch*-Reparaturgene *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* oder *PMS2*. Die vom Lynch-Syndrom betroffenen Patienten sind heterozygot für diese Mutationen (Lynch und de la Chapelle 2003; Ligtenberg et al. 2013).

Ein Teil der Patienten mit Lynch-Syndrom weist keine Mutationen der DNA-*Mismatch*-Reparaturgene, sondern eine Deletion im 16 Kilobasen stromaufwärts von *MSH2* (engl. *mutS homolog 2*) lokalisierten Gen *EPCAM* auf. Bei diesen Patienten ist das 3'-Ende des *EPCAM*-Gens inklusive des Terminationssignals deletiert, während das *MSH2*-Gen und dessen Promotorregion von der Deletion nicht betroffen sind (van der Klift et al. 2005; Kovacs et al. 2009; Ligtenberg et al. 2009; Ligtenberg et al. 2013). Das *EPCAM*-Gen kodiert für das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM (engl. *epithelial cell adhesion molecule*), welches in epitheliale Gewebe, wie beispielsweise dem Darm, hoch exprimiert wird (Winter et al. 2003; Uhlen et al. 2015). Deletionen am 3'-Ende des *EPCAM*-Gens konnten weltweit in Patienten mit Lynch-Syndrom unterschiedlicher Herkunft

nachgewiesen werden. Sie unterscheiden sich in Größe und Lage voneinander und machen circa zehn Prozent der *MSH2*-inaktivierenden Mutationen aus. Eine Analyse der Bruchpunkte dieser Deletionen zeigte, dass sie vorwiegend durch Rekombinationsereignisse zwischen zwei teilweise homologen Alu-Elementen entstanden sind (Ligtenberg et al. 2013). Alu-Elemente sind circa 280 Basenpaare lange, repetitive DNA-Sequenzen, die circa zehn Prozent des humanen Genoms ausmachen (Lander et al. 2001; Price et al. 2004). Da der betroffene Locus zahlreiche dieser Alu-Elemente aufweist, die sich über den gesamten Locus erstrecken, sind verschiedene Rekombinationsereignisse in der betreffenden Genregion möglich. Dies spiegelt sich in der großen Vielfalt an Deletionen wider, die in dieser Region in Patienten nachgewiesen wurden (Kuiper et al. 2011; Ligtenberg et al. 2013).

Bei den betroffenen Lynch-Syndrom-Patienten führt die Deletion des Terminationssignals des *EPCAM*-Gens zu einem verlängerten Transkript, welches mit dem stromabwärts liegenden *MSH2*-Gen überlappt. Ein daraus resultierendes *EPCAM-MSH2*-Fusionstranskript konnte in Leukozyten aus Blut betroffener Patienten nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die mit dem *MSH2*-Gen überlappende Transkription eine Allel-spezifische epigenetische Unterdrückung der *MSH2*-Expression verursacht (Abbildung 5) (Ligtenberg et al. 2009; Ligtenberg et al. 2013).

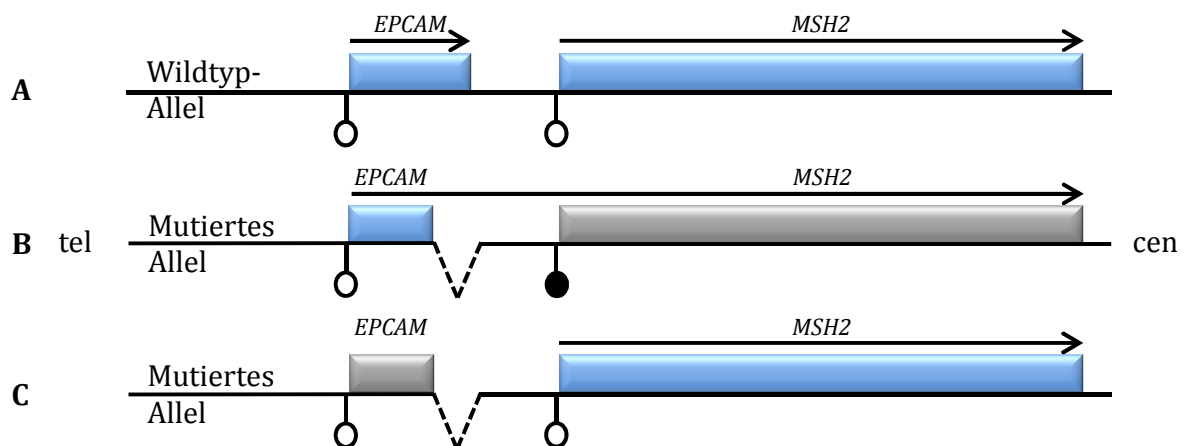


Abbildung 5: Übersicht über die Allel- und Zelltyp-spezifische Inaktivierung der *MSH2*-Genexpression in Patienten mit Lynch-Syndrom beschrieben von Ligtenberg et al. 2009. **A** Vom Wildtyp-Allel erfolgt die *MSH2*-Expression unabhängig von der Transkription des *EPCAM*-Gens. **B** Vom mutierten Allel wird das *MSH2*-Gen aufgrund der überlappenden Transkription in Geweben mit *EPCAM*-Expression nicht transkribiert und der *MSH2*-Promotor liegt hypermethyliert vor (ausgefüllter Kreis). **C** In Zellen, die das Gen *EPCAM* nicht exprimieren, wird das *MSH2*-Gen auch vom mutierten Allel normal exprimiert und die Promotorregion von *MSH2* ist unmethyliert (leerer Kreis). Inaktive Gene sind in grau und aktiv transkribierte Gene in blau dargestellt, wobei die Pfeile die Transkriptionsrichtung angeben. Cen (Centromer) und tel (Telomer) geben die Orientierung der Genregion an.

Durch die überlappende Transkription des *EPCAM*-Transkripts mit dem *MSH2*-Gen wird eine monoallelische Hypermethylierung der CpG-Insel von *MSH2* verursacht. Diese Hypermethylierung tritt Zelltyp-spezifisch und ausschließlich auf dem von der Deletion betroffenen Allel auf. Nur Zellen, die das Gen *EPCAM* transkribieren, weisen die Allel-spezifische Hypermethylierung des *MSH2*-Promotors auf (Abbildung 5B) (Ligtenberg et al. 2009).

1.6 Modelle der transkriptionellen Interferenz

Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien haben zum besseren Verständnis der TI beigetragen. Auf Grundlage der daraus gewonnenen Erkenntnisse wurden verschiedene Modelle zur Regulation der Genexpression durch TI entwickelt, bei denen die transkribierenden RNA-Polymerasen eines Gens die Initiation oder Elongation der Transkription eines benachbarten Gens stören.

1.6.1 Promotor-Konkurrenz

Mithilfe von *DNaseI-Footprint*-Analysen in *Escherichia coli* (*E. coli*) konnte gezeigt werden, dass bei überlappenden RNA-Polymerase-Bindestellen zweier Promotoren, die Initiation der Transkription nicht an beiden Promotoren gleichzeitig erfolgen kann. Auslöser für diese Interferenz ist nicht der Vorgang der Transkription, sondern vielmehr das Vorhandensein und die Besetzung des benachbarten, konkurrierenden Promotors (Abbildung 6) (Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011).

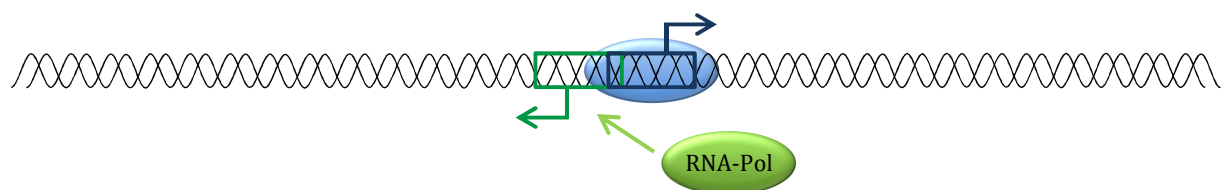


Abbildung 6: TI-Modell der Promotor-Konkurrenz. Überlappen die RNA-Polymerase-Bindestellen (dunkelblau und dunkelgrün) von zwei Promotoren, so kann aus sterischen Gründen die Initiation der Transkription nicht an beiden Promotoren gleichzeitig erfolgen. Weisen die RNA-Polymerasen dabei eine höhere Bindeaffinität zu einem der beiden Promotoren auf, so findet die Initiation der Transkription bevorzugt nur an diesem Promotor statt. Die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung der RNA-Polymerasen (hellblau und hellgrün) an. Neben der in diesem Beispiel dargestellten divergierenden Promotoranordnung, ist bei diesem Modell auch eine konvergente oder Tandem-Orientierung der Promotoren möglich. Eigene Darstellung nach Shearwin et al. 2005.

Ein Beispiel für TI durch Promotor-Konkurrenz ist die Regulation des *aroP*-Gens in *E. coli*. Das Gen *aroP* kodiert für ein Membranprotein, welches den Transport von aromatischen

Aminosäuren durch die Zellmembran ermöglicht. In Anwesenheit dieser Aminosäuren unterdrückt das regulatorische Protein TyrR zusammen mit Kofaktoren die Genexpression von *aroP* (Whipp und Pittard 1977; Pittard 1996). In Abwesenheit der aromatischen Aminosäuren und des TyrR-Proteins wird das Gen *aroP* hauptsächlich vom Promotor P1 transkribiert, die Transkription ist jedoch auch von einem anderen, stromabwärts gelegenen Promotor P2 möglich. Zusätzlich dazu befindet sich ein dritter Promotor, P3, in der regulatorischen Region des *aroP*-Gens, welcher in divergierender Richtung mit dem Promotor P1 überlappt und somit nicht zur Transkription des *aroP*-Gens führt (Wang et al. 1997; Wang et al. 1998).

Eine *in vitro* Studie untersuchte die Bindung der RNA-Polymerasen an die überlappenden Promotoren P1 und P3 in An- und Abwesenheit des TyrR-Proteins. Dabei zeigte sich, dass die *aroP*-Regulationsregion lediglich von einem und nicht von mehreren RNA-Polymerase-Molekülen gleichzeitig gebunden werden kann. Da die RNA-Polymerasen eine höhere Affinität zu Promotor P1 besitzen, wird das *aroP*-Gen in Abwesenheit des TyrR-Proteins von diesem Promotor transkribiert. In Anwesenheit des TyrR-Proteins und den entsprechenden Kofaktoren, fördert das TyrR-Protein die Bindung der RNA-Polymerasen an den in divergierender Richtung angeordneten Promotor P3. Somit binden die RNA-Polymerasen durch kooperative Interaktion mit dem TyrR-Protein bevorzugt an den P3-Promotor, wodurch die Bindung an den P1-Promotor aus sterischen Gründen verhindert wird. Auf diese Weise wird die Transkription des *aroP*-Gens vom Promotor P1 unterbunden (Wang et al. 1998).

Bei Eukaryoten kann dieses Modell der Promotor-Konkurrenz (engl. *promoter competition*) auch angewendet werden, wenn sich zwei Promotoren den gleichen *Enhancer* teilen. Die an den *Enhancer* gebundenen Transkriptionsfaktoren können nicht gleichzeitig mit beiden Promotoren interagieren, wodurch die Transkriptionsaktivität von einem der beiden Promotoren beeinträchtigt wird. Durch eine Duplikation der *Enhancer* kann dieser repressive Effekt aufgehoben werden (Choi und Engel 1988; Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011).

1.6.2 „Sitting-Duck“-Interferenz

Bei dem Modell der „Sitting-Duck“-Interferenz erfolgt die Initiation der Transkription am sensitiven Promotor sehr langsam. Durch die Ankunft eines Elongationskomplexes von einem benachbarten, starken Promotor, kann die Translokation des Initiationskomplexes am sensitiven Promotor hervorgerufen werden. Die Promotoren können dabei sowohl

konvergent als auch im Tandem zueinander angeordnet sein (Abbildung 7) (Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011).

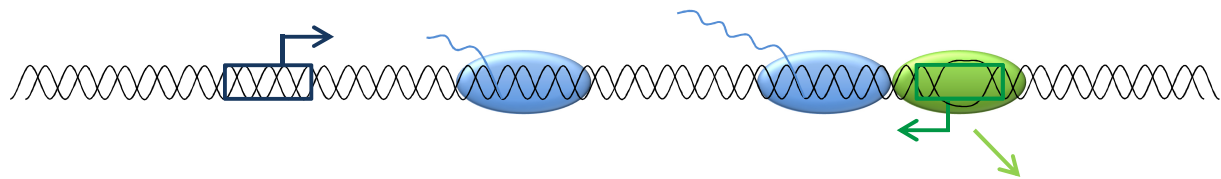


Abbildung 7: TI-Modell der „Sitting-Duck“-Interferenz. Erfolgt die Initiation der Transkription am sensitiven Promotor (dunkelgrün) mit geringer Geschwindigkeit, so kann der Initiationskomplex (hellgrün) durch eintreffende elongierende RNA-Polymerasen (hellblau) eines konvergenten, stärkeren Promotors transloziert werden. Dies hemmt die Transkriptionsaktivität am sensitiven Promotor. Neben der in diesem Beispiel dargestellten konvergenten Promotororientierung, ist bei diesem Modell auch eine Tandem-Orientierung der Promotoren möglich. Eigene Darstellung nach Shearwin et al. 2005.

Dieses Modell der TI wurde mittels Studien des Coliphagen 186 entwickelt, welcher zu den Bakteriophagen gehört (Callen et al. 2004). Bei den Bakteriophagen unterscheidet man zwischen dem lysogenen und dem lytischen Vermehrungszyklus. Beim lysogenen Zyklus integriert sich die Bakteriophagen-DNA in die chromosomale DNA des Bakteriums und wird bei den nachfolgenden Zellteilungen des Bakteriums zusammen mit der chromosomalen DNA repliziert. Der lytische Zyklus führt hingegen zur Lyse des Bakteriums und zur Freisetzung des Bakteriophagen (Lwoff 1953; Engelberg-Kulka und Kumar 2015). An der Umstellung vom lysogenen zum lytischen Zyklus sind beim Coliphagen 186 die konvergent angeordneten Promotoren pR und pL beteiligt. Der lytische Promotor pR weist, im Vergleich zum lysogenen Promotor pL , eine zehnfach höhere Transkriptionsaktivität auf (Dodd und Egan 2002). Durch verschiedene Anordnungen der Promotoren pR und pL und den Einsatz eines Transkriptionsterminators zwischen pR und pL , konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsaktivität am Promotor pL durch elongierende RNA-Polymerasen reprimiert wird, die über diesen Promotor transkribieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Loslösung des offenen Promotor-Komplexes am sensitiven Promotor pL verglichen zum Promotor pR deutlich langsamer erfolgt. Dies führte zur Entwicklung des Modells der „Sitting-Duck“-Interferenz (Callen et al. 2004).

In Prokaryoten kann die „Sitting-Duck“-Interferenz die Transkriptionsaktivität des sensitiven Promotors nur dann signifikant reprimieren, wenn die Frequenz der eintreffenden elongierenden RNA-Polymerasen höher ist als die Frequenz mit der die Transkriptionsinitiation am sensitiven Promotor erfolgt. Deutlich mehr Einfluss auf die Transkriptionsaktivität von Promotoren könnte die „Sitting-Duck“-Interferenz in Eukaryoten haben, da während der Initiation der Transkription bei Eukaryoten langlebige

Prä-Initiationskomplexe gebildet werden, die über mehrere Transkriptionsrunden bestehen bleiben. Diese könnten auch durch RNA-Polymerasen eines verhältnismäßig schwachen, stromaufwärts gelegenen Promotors transloziert werden und müssten somit bei jeder Runde der Transkription wiederum neu gebildet werden. Dies würde zu einer schwächeren Genexpression führen (Dieci und Sentenac 2003; Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011).

1.6.3 Transkriptions-Blockade

Theoretisch könnten offene Promotor-Komplexe, insbesondere bei konvergent angeordneten Promotoren, auch als Hindernis für eintreffende, elongierende RNA-Polymerasen eines anderen Promotors wirken. Manche dieser offenen Promotor-Komplexe, bei denen die Loslösung vom Promotor nur langsam erfolgt, könnten so fest an den Promotor gebunden sein, dass sie nicht wie bei der „*Sitting-Duck*“-Interferenz von der DNA transloziert werden, sondern ein Hindernis für die eintreffende, elongierende RNA-Polymerase darstellen. Dies könnte zur Translokation der elongierenden RNA-Polymerase anstelle des Initiationskomplexes führen (Abbildung 8) (Shearwin et al. 2005; Sneppen et al. 2005).

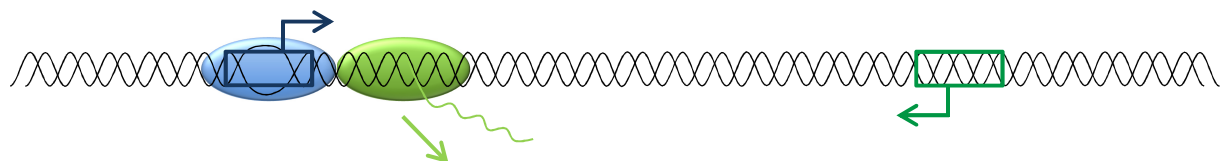


Abbildung 8: TI-Modell der Transkriptions-Blockade. Bei diesem Modell stellt ein offener Promotor-Komplex (hellblau) ein Hindernis für die eintreffende, elongierende RNA-Polymerase (hellgrün) dar. Der offene Promotor-Komplex ist dabei so stark an seinen Promotor gebunden, dass es zur Translokation des Elongationskomplexes anstelle des Initiationskomplexes kommt. Eigene Darstellung nach Shearwin et al. 2005.

Das TI-Modell der Transkriptions-Blockade (engl. *roadblock*) wurde bisher nicht durch experimentelle Studien bestätigt. Konvergent transkribierende RNA-Polymerasen könnten jedoch durch solch einen Mechanismus reguliert werden (Shearwin et al. 2005; Sneppen et al. 2005). Bei RNA-Polymerasen, die in die gleiche Richtung transkribieren, kommt es vermutlich eher zu einer Kooperation zwischen dem Promotor-gebundenen Komplex und dem eintreffenden Elongationskomplex. *In vitro* und *in vivo* Experimente in *E. coli* zeigen nämlich, dass RNA-Polymerasen, die in die gleiche Richtung transkribieren, gemeinsam DNA-gebundene Hindernisse überwinden können. Es kommt dabei zu einer Vorwärtstranslokation der blockierten RNA-Polymerase durch die nachfolgenden

RNA-Polymerasen. Hierfür muss die Transkription der betroffenen RNA-Polymerasen jedoch an einem starken Promotor initiiert werden (Epshtein et al. 2003; Hao et al. 2014). Auch Studien in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) zeigen, dass RNA-Polymerasen, die in die gleiche Richtung transkribieren, miteinander kooperieren und sich bei der Bewältigung von Hindernissen unterstützen können. Wenn eine RNA-Polymerase beispielsweise an einer Pausierungsstelle blockiert ist, können nachfolgende RNA-Polymerasen der blockierten RNA-Polymerase bei der Fortsetzung der Transkription helfen (Saeki und Svejstrup 2009).

1.6.4 Promotor-Okklusion

Bei dem Modell der Promotor-Okklusion (engl. *occlusion*) werden RNA-Polymerasen bzw. Transkriptionsfaktoren aus sterischen Gründen an der Promotorbindung gehindert. Dabei verdecken die von einem anderen Promotor eintreffenden Elongationskomplexe die Bindestellen des sensitiven Promotors (Abbildung 9) (Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011).

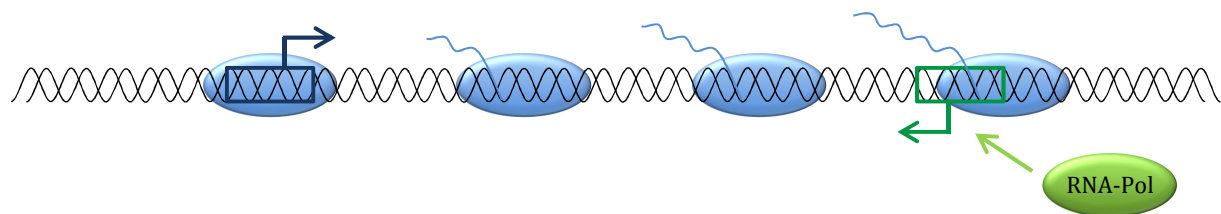


Abbildung 9: TI-Modell der Promotor-Okklusion. RNA-Polymerasen (hellblau), die den sensitiven Promotor (dunkelgrün) passieren, verdecken die Bindestellen des sensitiven Promotors. Die Bindung an den sensitiven Promotor durch RNA-Polymerasen (hellgrün) und Transkriptionsfaktoren wird daher aus sterischen Gründen behindert. Neben der in diesem Beispiel dargestellten konvergenten Promotoranordnung, ist bei diesem Modell auch eine Tandem-Orientierung der Promotoren möglich. Eigene Darstellung nach Shearwin et al. 2005.

Das Modell der Promotor-Okklusion wurde von Adhya und Gottesman vorgeschlagen, die Studien am Galactose-Operon von *E. coli* durchführten. Sie wiesen eine 30-fache Reduktion der Aktivität des *gal*-Promotors nach, wenn der stromaufwärts lokalisierte starke Prophagen-Promotor *pL* aktiv war (Adhya und Gottesman 1982).

Mathematischen Berechnungen zufolge kann diese starke Interferenz jedoch nicht ausschließlich durch den Mechanismus der Promotor-Okklusion erklärt werden. In den meisten Organismen findet die Elongation der Transkription mit einer hohen durchschnittlichen Geschwindigkeit statt, sodass die Bindestellen eines Promotors nur kurz verdeckt werden. Der Effekt der Promotor-Okklusion sollte daher, selbst bei sehr starken Promotoren, nur eine geringe Auswirkung haben (Sneppen et al. 2005; Palmer et al. 2011).

Einzelmolekül-Studien *in vitro* und *in vivo* zeigen jedoch, dass die Elongation der RNA-Polymerasen in *E. coli* und auch im Menschen häufig von Pausen unterbrochen wird, die sogar Minuten dauern können (Darzacq et al. 2007; Palmer et al. 2011). Eine RNA-Polymerase, welche über einem Promotor oder einer Transkriptionsfaktor-Bindestelle pausiert, kann daher eine starke Interferenz hervorrufen, auch wenn die durchschnittliche Geschwindigkeit der Transkriptionselongation hoch ist (Sneppen et al. 2005; Palmer et al. 2009; Palmer et al. 2011).

1.6.5 RNA-Polymerase-Kollision

Die konvergente Anordnung von Promotoren, kann zu einem Zusammenstoß elongierender RNA-Polymerasen und zur vorzeitigen Termination der Transkription von einem oder beiden beteiligten Komplexen führen (Abbildung 10) (Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011).

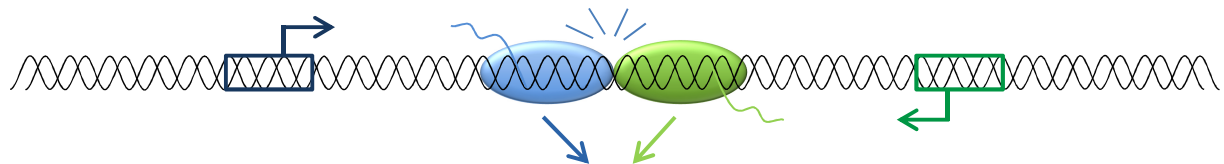


Abbildung 10: TI-Modell der RNA-Polymerase-Kollision. Eine konvergente Promotoranordnung kann zum Zusammenstoß der elongierenden RNA-Polymerasen führen und die vorzeitige Termination der Transkription von einem oder beiden beteiligten Komplexen zur Folge haben. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der konvergierenden RNA-Polymerasen (hellblau und hellgrün) an. Eigene Darstellung nach Shearwin et al. 2005.

Diese Erkenntnisse wurden durch Experimente mit der Hefe *S. cerevisiae* gewonnen. Die für die Galaktose-Fermentation benötigten Gene *GAL7* und *GAL10* sind im Genom von *S. cerevisiae* im Tandem angeordnet. Für eine Studie, die die Auswirkung einer konvergenten Anordnung dieser Gene auf die Transkriptionsaktivität der RNA-Polymerase II untersuchte, wurden die Gene *GAL7* und *GAL10* in geänderter Orientierung in das Genom der Hefe integriert. Das *GAL7*-Gen wurde konvergent zu *GAL10* angeordnet und die zwischen beiden Genen vorkommende intergenische Region inklusive der Terminationssignale entfernt. Die daraus resultierende überlappende Transkription führte zu einer vorzeitigen Termination des Elongationsvorgangs beider Gene. Aus diesen Erkenntnissen wurde das Modell der RNA-Polymerase-Kollision (engl. *collision*) entwickelt (Prescott und Proudfoot 2002).

Weitere Studien trugen zum besseren Verständnis des zu Grunde liegenden Mechanismus bei. Mithilfe der Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM, engl. *atomic force microscopy*) wurden die Auswirkungen einer konvergenten Transkription auf Molekülebene mit der

RNA-Polymerase von *E. coli in vitro* untersucht. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* ein bedeutender Anteil der konvergierenden RNA-Polymerasen nach der Kollision auf der DNA-Matrize verbleibt. Diese RNA-Polymerasen wurden in blockiertem Zustand nahe beieinander detektiert. Auch Rückwärtsbewegungen der RNA-Polymerasen, das sogenannte *Backtracking*, konnte als Folge konvergent transkribierender RNA-Polymerasen beobachtet werden. Ob zusätzlich dazu auch RNA-Polymerasen durch die Kollision von ihrer DNA-Matrize gestoßen oder von ihr aktiv entfernt werden, konnte mit dieser Studie nicht geklärt werden (Crampton et al. 2006).

Eine weitere Studie untersuchte ebenfalls die Auswirkungen einer konvergenten Kollision der RNA-Polymerasen in *S. cerevisiae*. Für die Experimente wurde eine ähnliche Anordnung der Gene *GAL7* und *GAL10* wie bei der bereits beschriebenen Studie genutzt. Der Einsatz induzierbarer Promotoren und ein abweichender Versuchsaufbau, erlaubten jedoch explizit die Untersuchung der RNA-Polymerase-Kollision ohne die Detektion anderer Effekte wie beispielsweise der Promotor-Okklusion. Die Studie bestätigte *in vitro*, dass zwei konvergent transkribierende RNA-Polymerase-Moleküle auch in Eukaryoten einander nicht passieren können, sondern miteinander kollidieren und an die DNA-Matrize gebunden bleiben. Somit stellen sie eine Transkriptions-Blockade für nachfolgende RNA-Polymerasen dar. Diese blockierten RNA-Polymerase-Moleküle können durch Ubiquitinierung und Abbau im Proteasom von ihrer DNA-Matrize entfernt werden, was mit *in vivo* Experimenten gezeigt werden konnte. In Zellen, die keine effiziente Ubiquitinierung aufweisen, konnte eine erhöhte Anzahl an blockierten RNA-Polymerasen nachgewiesen werden, die zwischen konvergent angeordneten Genen lokalisiert waren. Es ist möglich, dass es *in vivo* noch weitere Mechanismen zur Entfernung von blockierten RNA-Polymerasen oder Faktoren gibt, die es manchen RNA-Polymerasen erlauben einander zu passieren (Hobson et al. 2012).

Möglich ist auch, dass ein Teil der RNA-Polymerasen durch den Aufprall der Kollision von ihrer DNA-Matrize gestoßen werden oder dissoziieren. Danach könnte eine der beteiligten RNA-Polymerasen durch eine Vorwärtstranslokation nachfolgender RNA-Polymerasen aus ihrem blockierten Zustand befreit werden und ihre Transkription fortsetzen (Shearwin et al. 2005; Crampton et al. 2006).

Die RNA-Polymerase-Kollision spielt insbesondere bei starken, konvergent angeordneten Promotoren eine große Rolle, die weiter voneinander entfernt lokalisiert sind und deren Transkripte über eine weite Strecke miteinander überlappen (Sneppen et al. 2005; Osato et al. 2007; Palmer et al. 2011). Auch die Unterdrückung der paternalen *Ube3a*-Transkription in Neuronen der Maus lässt sich, wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, auf die Kollision

der RNA-Polymerasen, die *Snhg14* und *Ube3a* transkribieren, zurückführen. Hierbei überlappt das *Snhg14*-Transkript über eine weite Strecke mit dem *Ube3a*-Gen (Numata et al. 2011; Meng et al. 2013). Mathematische Modell zeigen zudem, dass der TI-Effekt bei der RNA-Polymerase-Kollision größer ist, wenn die konvergent angeordneten Gene in ähnlicher Stärke transkribiert werden (Bordoy und Chatterjee 2015).

Bei Promotoren, die im Tandem angeordnet sind, spielt der Mechanismus der RNA-Polymerase-Kollision, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle. Wie bereits erwähnt, kommt es bei einer Kollision von RNA-Polymerasen, die in die gleiche Richtung transkribieren, eher zu einer Kooperation zwischen den RNA-Polymerasen (Palmer et al. 2011).

1.7 Zielsetzung

Durch überlappende Transkription kann die Unterdrückung eines Transkriptionsprozesses durch einen anderen *in cis* hervorgerufen werden, was als transkriptionelle Interferenz bezeichnet wird.

In neuronalen Zellen des Menschen und der Maus überlappt die Transkription der lncRNA *Snhg14* mit dem paternalen *Ube3a*-Gen und führt zu dessen Inaktivierung. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Mechanismus aufgeklärt werden, der die monoallelische Genexpression von *Ube3a* in neuronalen Zellen der Maus reguliert. Durch Integration einer transkriptionellen Stoppkassette soll ein vorzeitiger Transkriptabbruch von *Snhg14* erzielt und hierdurch eine Überlappung mit dem *Ube3a*-Promotor verhindert werden. Dazu soll die Stoppkassette über homologe Rekombination in Intron 1 des paternalen *Ube3a*-Gens von murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) inseriert werden. Anschließend sollen die transgenen mES-Zellen in neuronale Zellen differenziert und die Auswirkungen des vorzeitigen Transkriptabbruchs von *Snhg14* auf die paternale *Ube3a*-Expression untersucht werden.

Das Hauptziel dieser Arbeit besteht jedoch in der Etablierung eines Zellkulturmodells, welches die Untersuchung von überlappender Transkription und ihrer Auswirkung auf beliebige humane Promotoren erlaubt. Des Weiteren soll es Untersuchungen zur genomischen Prägung ermöglichen, da bei der Etablierung der DNA-Methylierung an einigen maternal methylierten Loci eine mit diesem Bereich überlappende Transkription stattfindet. Weil die Etablierung dieser Markierungen bereits in der Keimbahn erfolgt und humane Oozyten für die Untersuchung dieses Prozesses nur eingeschränkt zur Verfügung stehen, soll dieses Zellkulturmodell hierfür eine wertvolle Alternative bieten. Die für die Etablierung des Modells ausgewählten Promotoren der Gene *UBE3A*, *HBA2* und *MSH2* sollen auf ihre Aktivität hin überprüft und anschließend für die Klonierung der sogenannten Minigene genutzt werden. Die Minigene, bestehend aus dem jeweiligen Testpromotor und dem *EGFP*-Gen, sollen konvergent oder im Tandem zu einem zweiten, induzierbaren Promotor angeordnet werden. Dieser mit Doxycyclin induzierbare *CMV*-Promotor soll die Expression eines zweiten Transkripts, Exon 2 und 3 des β -Globin-Gens des Kaninchens, regulieren. Nach der stabilen Integration dieses Konstruktes in die humane Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293, soll durch Zugabe von Doxycyclin eine Induktion des *CMV*-Promotors erfolgen. Die Auswirkungen der daraus resultierenden überlappenden Transkription auf die *EGFP*- und Exon_2/3-Transkription sollen untersucht und mögliche Änderungen des Methylierungszustandes der Testpromotoren ermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Für die vorliegende Arbeit wurden Chemikalien und Reagenzien der folgenden Firmen verwendet: AppliChem (Darmstadt), BD (Heidelberg), Bio-Rad Laboratories (München), Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), VWR International (Langenfeld), Sigma-Aldrich (Hamburg) und Thermo Fisher Scientific (Braunschweig).

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Die verwendeten Puffer, Medien und Lösungen wurden, falls nicht anders beschrieben und mit Ausnahme der Medien für die Kultivierung von murinen und humanen Zellen, mit deionisiertem Wasser angesetzt.

2.1.2.1 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

1 x TAE-Puffer	40 mM Tris
	40 mM Essigsäure
	1 mM EDTA pH 8,0

2.1.2.2 Medien für die Kultivierung von Bakterien

Alle Medien für die Kultivierung von Bakterien wurden direkt nach dem Ansetzen autoklaviert.

Luria-Bertani(LB)-Flüssigmedium	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l Natriumchlorid
Luria-Bertani(LB)-Agar	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l Natriumchlorid
	12 g/l Agar

Selektionsmedium	100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin bzw. 20 µg/ml Chloramphenicol in LB-Flüssigmedium/-Agar Das jeweilige Antibiotikum wurde dem autoklavierten, auf Raumtemperatur abgekühlten, LB-Flüssigmedium bzw. LB-Agar hinzugefügt.
------------------	--

2.1.2.3 Medien und Reagenzien für die Kultivierung von murinen und humanen Zellen

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Medien und Reagenzien zur Kultivierung muriner und humaner Zellen sind nachfolgend aufgeführt. Im Anschluss daran ist die Zusammensetzung der daraus hergestellten Medien angegeben.

<i>Fetal Bovine Serum Gold</i>	PAA Laboratories (Cölbe), #A15-151 Das fötale bovine Serum (FBS) wurde für die Kultivierung der murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) von Dr. L. Steenpaß (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) ausgetestet.
--------------------------------	--

<i>Fetal Bovine Serum, qualified, E.U.-approved, South America origin</i>	Thermo Fisher Scientific, #10270-106 FBS für die Kultivierung der murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) und der Flp-In™-T-REx™-293-Zellen unter Standardbedingungen.
---	---

<i>Fetal Bovine Serum, certified, US origin</i>	Thermo Fisher Scientific, #16000-044 Dieses FBS wurde ausschließlich für Experimente mit den Flp-In™-T-REx™-293-Zellen eingesetzt. Die verwendete Charge wurde laut Herstellerangaben getestet und als Tetracyclin-frei deklariert.
---	---

LIF (engl. *leukemia inhibitory factor*) LIF inhibiert die spontane Differenzierung von mES-Zellen und wurde für die Kultivierung der mES-Zellen von Dr. L. Steenpaß (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) aufgereinigt und ausgetestet.

<i>DMEM, high glucose, HEPES</i>	Thermo Fisher Scientific, #42430-082
<i>Neurobasal® Medium</i>	Thermo Fisher Scientific, #21103-049
<i>DMEM/F-12, GlutaMAX™ Supplement</i>	Thermo Fisher Scientific, #31331-028
<i>DMEM, high glucose, pyruvate</i>	Thermo Fisher Scientific, #41966-052
<i>Opti-MEM® I Reduced Serum Medium</i>	Thermo Fisher Scientific, #31985-062
<i>N-2 Supplement (100X)</i>	Thermo Fisher Scientific, #17502-048
<i>B-27® Supplement (50X), serum free</i>	Thermo Fisher Scientific, #17504-044
<i>Murine Epidermal Growth Factor rec.</i>	PAN-Biotech (Aidenbach), #CB-1214121
L-Glutamin (200 mM)	Thermo Fisher Scientific, #25030-024
2-Mercaptoethanol (50 mM)	Thermo Fisher Scientific, #31350-010
Penicillin-Streptomycin (10.000U/ml)	Thermo Fisher Scientific, #15140-122
Blasticidin S	InvivoGen (Toulouse, Frankreich), #ant-bl-1
Zeocin™	InvivoGen, #ant-zn-1
Hygromycin B Gold	InvivoGen, #ant-hg-1
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, #D9891-1G
DMSO	Sigma-Aldrich, #D2650
<i>DPBS, no calcium, no magnesium</i>	Thermo Fisher Scientific, #14190-169
<i>Trypsin-EDTA (0.5%), no phenol red</i>	Thermo Fisher Scientific, #15400-054

Standardmedium für die Kultivierung von mES-Zellen

15 % (v/v) *Fetal Bovine Serum Gold*
 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (100 x konz.)
 2 mM L-Glutamin
 0,1 mM 2-Mercaptoethanol
 0,02 % (v/v) LIF
 in *DMEM, high glucose, HEPES*

N2B27-Medium für die neuronale Differenzierung von mES-Zellen

50 % (v/v) *Neurobasal® Medium*
50 % (v/v) *DMEM/F-12, GlutaMAX™ Supplement*
0,5 % (v/v) *N-2 Supplement (100X)*
1 % (v/v) *B-27® Supplement (50X), serum free*
1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (100 x konz.)
2 mM L-Glutamin
0,1 mM 2-Mercaptoethanol

Einfriermedium für die mES-Zellen 90 % (v/v) *Fetal Bovine Serum Gold*
10 % DMSO

Standardmedium für die Kultivierung von MEFs

10 % (v/v) *Fetal Bovine Serum, South America origin*
1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (100 x konz.)
in *DMEM, high glucose, pyruvate*

Standardmedium für die Kultivierung der Wildtyp-Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293

10 % (v/v) *Fetal Bovine Serum, South America origin*
1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (100 x konz.)
50 µg/ml Zeocin™
15 µg/ml Blasticidin S
in *DMEM, high glucose, pyruvate*

Selektionsmedium für die Kultivierung transgener Flp-In™-T-REx™-293-Zellen

10 % (v/v) *Fetal Bovine Serum, South America origin*
bzw. *Fetal Bovine Serum, US origin*
1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (100 x konz.)
100 µg/ml Hygromycin B Gold
15 µg/ml Blasticidin S
in *DMEM, high glucose, pyruvate*

Induktionsmedium für die Kultivierung transgener Flp-In™-T-REx™-293-Zellen

1 µg/ml Doxycyclin

in Selektionsmedium für transgene Flp-In™-T-REx™-293-Zellen

Einfriermedium für die MEFs und Flp-In™-T-REx™-293-Zellen

90 % (v/v) *Fetal Bovine Serum, South America origin*

10 % (v/v) DMSO

2.1.2.4 Lösungen für den *lacZ*-Test

Fixierlösung

1 % (v/v) Formaldehyd

0,2 % (v/v) Glutaraldehyd

in DPBS

Färbelösung

5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) K₃[Fe(CN)₆]

5 mM Kaliumhexacyanoferrat(II) K₄[Fe(CN)₆]

2 mM Magnesiumchlorid

1 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid

in DPBS

2.1.3 Organismen

2.1.3.1 DH5α kompetente *E. coli*

Der Stamm DH5α des gramnegativen Bakteriums *E. coli* wurde von der Firma Thermo Fisher Scientific (#18265-017) chemisch kompetent erworben. Er wurde für konventionelle Klonierungen eingesetzt und besitzt folgenden Genotyp:

F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-.

2.1.3.2 SURE 2 superkompetente *E. coli*

Die SURE 2 superkompetenten *E. coli* der Firma Agilent Technologies (Waldbronn; #200152) besitzen eine besonders hohe Transformationseffizienz und erleichtern die Klonierung von DNA-Sequenzen, welche Sekundärstrukturen oder invertierte Wiederholungssequenzen beinhalten. Diese Sequenzen können von *E. coli* rekombiniert oder deletiert werden. Die SURE 2 superkompetenten *E. coli* sind defizient für die dafür

verantwortlichen Gene und wurden daher für die Klonierung entsprechender DNA-Sequenzen eingesetzt. Der Bakterienstamm besitzt folgenden Genotyp:

e14-(McrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr].

2.1.3.3 Dam-/Dcm-kompetente *E. coli*

Dam-/Dcm- chemisch kompetente *E. coli* der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main; #C2925 H) wurden eingesetzt, wenn Plasmide ohne Dam- bzw. Dcm-Methylierung benötigt wurden. Die Dam- und Dcm-Methyltransferase methyliert die Erkennungssequenz mancher Restriktionsendonukleasen und behindert dadurch deren Enzymaktivität. Um dies zu verhindern wurden die entsprechenden Klonierungen mit dem Dam-/Dcm-Bakterienstamm durchgeführt, welcher folgenden Genotyp aufweist:

ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) TetS endA1 rspL136 (StrR) dam13::Tn9 (CamR) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2.

2.1.3.4 Murine embryonale Stammzellen

Die mES-Zellen E141C04 wurden vom *German Gene Trap Consortium* (Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Neuherberg) unter Verwendung der mES-Zelllinie E14.Tg2A.4 (Mausstamm-Hintergrund 129/Ola) hergestellt. Sie besitzen ein promotorloses *lacZ*-Neomycin-Resistenz-Reportergen, welches am 5'-Ende von einem *Splice*-Akzeptor und am 3'-Ende von einem Transkriptionsterminationssignal flankiert wird. Die *lacZ*-Neomycin-Resistenz-Kassette integrierte in Intron 4 des *Ube3a*-Gens eines Allels und wird daher durch den endogenen *Ube3a*-Promotor transkribiert. Das entstehende Fusionstranskript endet aufgrund des inserierten Transkriptionsterminationssignals vorzeitig nach der *lacZ*-Neomycin-Resistenz-Kassette. Durch den *Splice*-Akzeptor am 5'-Ende wird die Sequenz des *lacZ*-Neomycin-Resistenz-Fusionsgens an Exon 4 des *Ube3a*-Gens gespleißt und führt damit zu einem Fusionstranskript aus Exon 1 bis 4 des *Ube3a*-Gens, der *lacZ*-Sequenz und der Neomycin-Resistenzsequenz. Die Expression des *lacZ*-Gens, welches für das Enzym β-Galactosidase kodiert, kann mittels *lacZ*-Tests nachgewiesen werden.

2.1.3.5 Murine embryonale Fibroblasten

Mitotisch inaktivierte MEFs werden für die Kultivierung von mES-Zellen eingesetzt, um deren Ausdifferenzierung zu verhindern. Hierfür wurden MEFs aus Neomycin- und

Hygromycin-resistenten Mäusen (Mausstamm C57BL/6J-TgN(pPWL5I2hyg)IEms (Johnson et al. 1995) sowie B6.129S4-Gt(ROSA)26Sortm1Sor/J (Soriano 1999)) verwendet, welche von Dr. L. Steenpaß (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen) durch ionisierende Strahlung mit einer Energiedosis von 40 Gray wachstumsinhibiert wurden.

2.1.3.6 Flp-In™ T-REx™ 293

Das Flp-In™-T-REx™-293-System (Thermo Fisher Scientific) ermöglicht die einfache Herstellung stabiler Expressionszelllinien. Die humane, adhärent wachsende Zelllinie besitzt ein *lacZ*-Zeocin-Resistenz-Fusionsgen und eine FRT-Rekombinationsstelle, welche sich hinter dem Startcodon des *lacZ*-Zeocin-Resistenz-Fusionsgens befindet. An einem davon unabhängigen Genort weist die Zelllinie zudem ein Tet-Repressorgen, gefolgt von einem Blasticidin-Resistenzgen, auf. Die Ausgangszelllinie ist daher resistent gegen Zeocin sowie Blasticidin und besitzt ein aktives *lacZ*-Gen, welches das Enzym β -Galactosidase kodiert. Die Aktivität dieses Enzyms kann mithilfe eines *lacZ*-Tests nachgewiesen werden.

Die Herstellung stabiler Expressionszelllinien erfolgt durch Kotransfektion mit dem pcDNA5/FRT/TO-Expressionsplasmid, welches die gewünschte Zielsequenz und ebenfalls eine FRT-Rekombinationsstelle enthält, sowie mit dem pCSFLPe-Plasmid, welches das Flp-Rekombinase-Enzym kodiert. Nach der erfolgreichen Transfektion vermittelt die Flp-Rekombinase die Rekombination zwischen der FRT-Stelle im Expressionsplasmid und jener im Genom der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293. Dies führt zur Integration der Zielsequenz ins Genom der Zellen an der FRT-Rekombinationsstelle. Durch dieses Rekombinationsereignis verliert das *lacZ*-Zeocin-Resistenz-Fusionsgen sein Startcodon, weshalb das Gen nicht mehr exprimiert werden kann. Die erfolgreich transfizierten Zellen sind daher nicht mehr resistent gegen Zeocin und besitzen keine β -Galactosidaseaktivität mehr. Durch eine auf dem Expressionsplasmid kodierte Hygromycin-Resistenz sind die stabilen Expressionszelllinien nun jedoch resistent gegen Hygromycin.

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. G. Ryffel (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt.

2.1.4 DNA-Größenstandards

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Größenstandards *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, *MassRuler DNA Ladder Mix* und *MassRuler Low Range DNA Ladder* der Firma Thermo Fisher Scientific eingesetzt.

2.1.5 Oligonukleotide

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers (Ulm) und Metabion (Planegg) synthetisiert und sind in Kapitel 8.1 des Anhangs aufgeführt. Sie wurden in deionisiertem Wasser der Firma Merck von 100 μM auf eine Konzentration von 10 μM verdünnt. Sonden für qRT-PCR-Analysen wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Mithilfe des *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* von Roche Diagnostics wurden die für die qRT-PCR-Analyse verwendeten *Primer* und Sonden auf folgender Webseite generiert: <https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1>.

Primer für Methylierungsanalysen wurden, falls möglich, unter zu Hilfenahme von *MethPrimer* (Li und Dahiya 2002) auf folgender Webseite bestimmt:

<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>.

2.1.6 Plasmide

pCR™2.1	Vektor für die Klonierung PCR-vervielfältigter DNA-Fragmente mit 3'-Überhang. Bestandteil des <i>TA Cloning® Kit</i> (Thermo Fisher Scientific)
pCR™-Blunt II-TOPO®	Vektor für die Klonierung PCR-vervielfältigter DNA-Fragmente ohne 3'-Überhang. Bestandteil des <i>Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit</i> (Thermo Fisher Scientific)
pBluescript II KS(+)	Vektor mit multipler Klonierungsstelle für die Insertion Restriktionsendonuklease-gespaltener DNA-Fragmente. (Agilent Technologies; GenBank: X52327.1)
pACYC184_D4	Vektor mit geringer Replikationsrate und multipler Klonierungsstelle für die Insertion Restriktionsendonuklease-gespaltener DNA-Fragmente. Das Plasmid wurde durch Insertion der multiplen Klonierungsstelle des pBluescript-Klonierungsvektors und der Promotoren T3 und T7 in pACYC184 (New England Biolabs; Genbank: X06403) erzeugt und freundlicherweise von Dr. R.

Waldschütz (Zentrales Tierlaboratorium, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt.

bMQ253k03

Bakterielles artifizielles Chromosom (BAC, engl. *bacterial artificial chromosome*), welches mit DNA von AB2.2-mES-Zellen (Mausstamm 129S7/SvEvBrd-Hprt^{b-m2}) erzeugt wurde (Adams et al. 2005).

Der 129S7/AB2.2-BAC-Klon enthält unter anderem Intron 1 des murinen *Ube3a*-Gens im Vektor pBACe3.6 und wurde von der Firma Source BioScience (Berlin) bezogen.

pGL4.10[*luc2*]

Plasmid, welches das promotorlose Luciferase-Gen von *Photinus pyralis* zur Durchführung der Luciferaseaktivitätsmessung beinhaltet.

(Promega, Mannheim)

pGL4.74 [*hRluc*/TK]

Plasmid, welches das Luciferase-Gen von *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des *HSV-TK*-Promotors enthält und als Transfektionskontrolle für die Luciferaseaktivitätsmessung eingesetzt wurde.

(Promega)

pGL4.10-*TRPS1*normalpromoterH1

Plasmid, welches das Luciferase-Gen von *Photinus pyralis* unter der Kontrolle des *TRPS1*-Promotors enthält und als Positivkontrolle für die Luciferaseaktivitätsmessung eingesetzt wurde. Das Plasmid wurde von Dr. S. Gkalypoudis während ihrer Promotion am Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Essen) kloniert.

pGL4.10-*HSV-TK*

Plasmid, welches das Luciferase-Gen von *Photinus pyralis* unter der Kontrolle des *HSV-TK*-Promotors enthält und als Positivkontrolle für die Luciferaseaktivitätsmessung eingesetzt wurde. Das Plasmid wurde von Dr. S. Gkalypoudis während

ihrer Promotion am Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Essen) kloniert.

pBS_tkneo511_BGfrt Plasmid, welches das Thymidinkinasegen des *Herpes-simplex*-Virus, ein Neomycin-Resistenzgen und das partielle Exon 2 sowie das vollständige Intron 2 und Exon 3 des β -Globingens des Kaninchens beinhaltet (Sleutels et al. 2002).

Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. D. Barlow (CeMM, Forschungszentrum für Molekulare Medizin GmbH, Österreichische Akademie der Wissenschaften, Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt.

pEGFP_N3 Plasmid, welches das Reportergen *EGFP* unter der Kontrolle des *CMV*-Promotors beinhaltet.

(Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich; Genbank: U57609)

pZErO-HBA4kbXhoI Plasmid, welches das humane *HBA2*-Gen und seinen Promotor enthält (Tufarelli et al. 2003).

Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. C. Tufarelli (School of Medicine, Royal Derby Hospital, Derby, UK) zur Verfügung gestellt.

pcDNA5/FRT/TO[®] Vektor mit einem *CMV*-Promotor, einem Hygromycin-Resistenzgen und einer FRT-Rekombinationsstelle für die Integration von Zielgenen in die humane Zelllinie Flp-In[™] T-REx[™] 293.

(Thermo Fisher Scientific)

pCSFLPe Plasmid mit dem Flp-Rekombinase-Gen für die Integration von Zielgenen in die humane Zelllinie Flp-In[™] T-REx[™] 293 (Werdien et al. 2001).

Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Dr. G. Ryffel (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt.

FRT-*GFP2* pcDNA5/FRT/TO-Vektor mit integriertem *GFP*-Reportergen, welcher als Positivkontrolle für die stabile Transfektion verwendet wurde (Lucas et al. 2005).

Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Dr. G. Ryffel (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt.

2.2 Kulturtechniken und zellbiologische Methoden

2.2.1 Auftauen kryokonservierter Zellen

Kryokonservierte murine und humane Zellen wurden kurzfristig bei -80 °C sowie langfristig in flüssigem Stickstoff bei -195 °C gelagert. Für die erneute Kultivierung nach der Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend zu 9 ml vorgewärmtem Medium gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt von 4 min bei 200 x g, wurde der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen in 1 ml Medium resuspendiert. Abhängig von der Zellzahl wurden die Flp-In™-T-REx™-293-Zellen anschließend zu 4 ml Medium in eine 25cm²-Zellkulturflasche bzw. 11 ml Medium in eine 75cm²-Zellkulturflasche gegeben. MEFs wurden in 10 ml Medium aufgenommen und auf eine mit 0,1 % Gelatine beschichtete 10cm-Zellkulturschale überführt. Die Kultivierung der mES-Zellen erfolgte nach dem Auftauen auf 10cm-Zellkulturschalen, welche mit mitotisch inaktivierten MEFs und 9 ml Medium vorbereitet wurden.

2.2.2 Kultivierung der murinen embryonalen Stammzellen

Die Kultivierung der mES-Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Um eine Ausdifferenzierung der undifferenzierten mES-Zellen zu verhindern, wurde das Medium mit LIF angereichert und die mES-Zellen auf mitotisch inaktivierten MEFs kultiviert. Ein bis zwei Tage bevor die mES-Zellen passagiert werden konnten, wurden daher wachstumsinhibierte MEFs auf einer mit 0,1 % Gelatine beschichteten 10cm-Zellkulturschale aufgetaut (siehe Kapitel 2.2.1) und bei 37 °C in Standardmedium kultiviert. Das Passagieren der mES-Zellen erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche. Dazu wurde das Medium mithilfe einer Vakuumpumpenapparatur von den adhärent wachsenden Zellen abgesaugt und die mES-Zellen anschließend mit DPBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml 0,05 % Trypsin-EDTA und Inkubation bei 37 °C für 3 min wurden die mES-Zellen zunächst abgelöst, mit der Pipette dissoziiert und schließlich in 9 ml Medium aufgenommen. In einem darauf folgenden Zentrifugationsschritt bei 200 x g für 4 min wurden die

mES-Zellen sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in frischem Standardmedium zur Kultivierung von mES-Zellen aufgenommen. Im Anschluss daran wurde das Medium von den vorbereiteten MEFs abgenommen und circa 1/10 der mES-Zellsuspension vorsichtig darauf gegeben. Um die Ausdifferenzierung der mES-Zellen zu verhindern, wurde das Medium täglich erneuert.

2.2.3 Neuronale Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen

Die Differenzierung der mES-Zellen in neuronale Zellen basierte auf dem Protokoll von Ying et al. 2003. Um die MEFs auszudünnen, wurden die mES-Zellen zunächst in Standardmedium auf 0,1 % Gelatine kultiviert und dreimal passagiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin-EDTA abgelöst, dissoziiert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Danach wurden jeweils 2×10^6 mES-Zellen in zwei 6cm-Zellkulturschalen ausgesät, welche ebenfalls zuvor mit 0,1 % Gelatine beschichtet wurden. Bereits 24 Stunden später wurden die Zellen erneut passagiert. Dabei wurden jeweils 5×10^5 mES-Zellen in sechs mit Gelatine beschichtete 6cm-Zellkulturschalen in N2B27-Medium ausgesät. Das Medium wurde eine Woche lang täglich erneuert und die Zellen an Tag acht in 6cm-Zellkulturschalen umgesetzt, welche mit $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Laminin (Sigma-Aldrich) beschichtet wurden. Dazu wurden jeweils 3×10^5 Zellen in zehn mit Laminin beschichtete 6cm-Zellkulturschalen in 20 ng/ml EGF-haltigem N2B27-Medium ausgesät. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel mit N2B27-Medium durchgeführt, welches mit 20 ng/ml EGF angereichert wurde. Da die Zellen ein auf einem der beiden Allele des *Ube3a*-Gens integriertes *lacZ*-Gen besitzen, wurden während der neuronalen Differenzierung *lacZ*-Tests durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.8).

2.2.4 Kultivierung der humanen Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293

Die humane Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 und ihre Derivate wurden bei 37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer Konfluenz von 10 - 90 % kultiviert. Das Medium, welches für die Kultivierung der Ausgangszelllinie eingesetzt wurde, bestand aus DMEM, FBS, Penicillin-Streptomycin, Blastocidin und Zeocin. Die transgenen Zelllinien wurden in Medium kultiviert, welches Hygromycin anstelle von Zeocin enthielt.

Unter Standardbedingungen wurde das Medium alle zwei bis drei Tage erneuert. Hierfür wurde das Medium mithilfe einer Vakuumpumpenapparatur von den adhärent wachsenden Zellen abgesaugt und frisches, vorgewärmtes Medium hinzugegeben. Während der Durchführung von Experimenten wurde das Medium täglich gewechselt (siehe Kapitel 2.2.9). Zweimal pro Woche wurden die adhärent wachsenden Zellen bei Erreichen von circa

90 % Konfluenz passagiert. Dazu wurden sie zunächst mit DPBS gewaschen und, durch Zugabe von 0,5 - 2 ml 0,05 % Trypsin-EDTA und Inkubation bei 37 °C für 2 min, abgelöst. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in der Regel 1/10 bis 1/20 der Zellsuspension in ein neues Zellkulturgefäß mit vorbereitetem, vorgewärmtem Medium überführt. Für das Aussäen einer definierten Anzahl von Zellen wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.5 Transiente und stabile Transfektion

2.2.5.1 Transiente Transfektion

Für die Luciferaseaktivitätsmessungen (siehe Kapitel 2.3.21) wurde die Flp-In™-T-REx™-293-Ausgangszelllinie transient mit dem jeweiligen Luciferase-Reporterplasmid (pGL4.10-Testpromotor) und dem Luciferase-Kontrollplasmid (pGL4.74) kotransfiziert.

Am Vortag wurden hierfür zunächst 1×10^4 Zellen pro Vertiefung in einer 96-Well-Luminometerplatte ausgesät und am nachfolgenden Tag, zwei Stunden vor Beginn der Transfektion, das Medium gewechselt. Für die Transfektion wurde sowohl die Plasmid-DNA als auch das Transfektionsreagenz *Lipofectamine*® 2000 (Thermo Fisher Scientific) separat in *Opti-MEM*® I Reduced Serum Medium verdünnt und 5 min inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Ansätze vereint, vorsichtig gemischt und für weitere 20 min inkubiert. Die dabei gebildeten Komplexe wurden auf die vorbereiteten Zellen getropft und durch vorsichtige Bewegungen der Luminometerplatte verteilt. Pro Zellansatz wurden 0,5 µl *Lipofectamine*® 2000, 50 ng pGL4.10-Testpromotor-DNA und 2,5 ng pGL4.74-Plasmid-DNA eingesetzt. Nach 24 Stunden wurde erneut das Medium gewechselt und 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte schließlich die Luciferaseaktivitätsmessung.

2.2.5.2 Stabile Transfektion

Die Herstellung stabiler Expressionszelllinien erfolgte durch Kotransfektion der Flp-In™-T-REx™-293-Ausgangszelllinie mit dem Flp-Rekombinase-Plasmid pCSFLPe und dem pcDNA5/FRT/TO-Expressionsplasmid, welches Exon_2/3 des β-Globin-Gens des Kaninchens, *EGFP* und den jeweiligen Testpromotor enthielt.

Es wurden $1,2 \times 10^5$ Zellen der Flp-In™-T-REx™-293-Ausgangszelllinie pro Vertiefung in einer 6-Well-Platte ausgesät und hierfür Medium ohne die Selektionsantibiotika Blasticidin und Zeocin verwendet. Zwei Tage später erfolgte die Transfektion mithilfe des Transfektionsreagenz *Lipofectamine*® 2000 (Thermo Fisher Scientific) wie in Kapitel 2.2.5.1 für die transiente Transfektion beschrieben. Im Unterschied zur transienten Transfektion

wurden jedoch 3 μ l *Lipofectamine*[®] 2000 und 1 μ g DNA, bestehend aus 100 ng pcDNA5/FRT/TO-Expressionsplasmid-DNA und 900 ng pCSFLPe-Plasmid-DNA, pro Ansatz eingesetzt. Pro Konstrukt wurden jeweils zwei Ansätze transfiziert und zusätzlich dazu die Positivkontrolle FRT-*GFP2* sowie eine Negativkontrolle, die nur mit pCSFLPe-Plasmid-DNA transfiziert wurde, mitgeführt.

24 Stunden nach der Transfektion wurden die adhärent wachsenden Zellen mit DPBS gewaschen und durch Zugabe von 0,5 ml 0,05 % Trypsin-EDTA und Inkubation für 2 min bei 37 °C abgelöst. Jeweils ein Zellansatz wurde anschließend gleichmäßig auf zwei 10cm-Zellkulturschalen verteilt, sodass eine Konfluenz von maximal 25 % nicht überschritten wurde. Hierfür wurde weiterhin Medium ohne Selektionsantibiotika verwendet. Die Selektion transgener Zellen erfolgte weitere 24 Stunden später, wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben.

2.2.6 Selektion transgener Zellen

Nach erfolgreicher Integration des pcDNA5/FRT/TO-Expressionsplasmids an der FRT-Rekombinationsstelle, weisen die Flp-In[™]-T-REx[™]-293-Zellen eine Hygromycin-Resistenz anstelle einer Zeocin-Resistenz auf. Transgene Zellen können daher mit Hygromycin-haltigem Medium angereichert werden. 48 Stunden nach der Transfektion wurde mit der Selektion transgener Zellen begonnen, indem die Zellen ab diesem Zeitpunkt in Selektionsmedium kultiviert wurden. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert, bis nach elf bis 13 Tagen keine lebenden Zellen mehr in der Negativkontrolle vorhanden waren. Die in den anderen 10cm-Zellkulturschalen gewachsenen Zellkolonien konnten dann isoliert werden (siehe Kapitel 2.2.7).

2.2.7 Isolation transgener Zellklone

Wies die Negativkontrolle nach der in Kapitel 2.2.6 beschriebenen Selektion keine lebenden Zellen mehr auf, so konnten die in den anderen Zellkulturschalen gewachsenen transgenen Zellklone isoliert werden. Pro Konstrukt wurden zwölf Zellkolonien, welche aus einer Einzelzelle hervorgegangen waren, isoliert und im Anschluss daran getrennt weiterkultiviert. Dazu wurden die entsprechenden Kolonien zunächst unter einem Inversmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss Jena, Jena) markiert und die Zellen anschließend mit DPBS gewaschen. Für die Isolation der Zellklone wurden selbst hergestellte Klonierungsringe verwendet, welche aus dem oberen Teil von 200 μ l-Pipettenspitzen zugeschnitten und anschließend autoklaviert wurden. Die Klonierungsringe wurden schließlich in autoklavierte Vaseline getupft und danach um die zu isolierenden Zellkolonien

gesetzt. Zum Ablösen der Zellen wurden 40 µl 0,05 % Trypsin-EDTA in den jeweiligen Klonierungsring gegeben und 2 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 160 µl Selektionsmedium und anschließendes Auf- und Abpipettieren des Mediums wurden die Zellklone von der 10cm-Zellkulturschale abgelöst, vereinzelt und anschließend in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte mit 0,5 ml Selektionsmedium gegeben. Bis zum Erreichen von circa 90 % Konfluenz, wurden die Zellen in der 24-Well-Platte kultiviert und schließlich expandiert. Im Anschluss daran erfolgte die Kontrolle der transgenen Zelllinien mithilfe eines *lacZ*-Tests (siehe Kapitel 2.2.8).

2.2.8 Kontrolle transgener Zelllinien mittels *lacZ*-Test

Die erfolgreiche Integration des Zielgens an der FRT-Rekombinationsstelle im Genom der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 kann mithilfe einer Färbung nachgewiesen werden. Durch die Rekombination zwischen den FRT-Stellen im Expressionsplasmid und im Genom der Flp-In™-T-REx™-293-Zellen verliert das *lacZ*-Zeocin-Resistenz-Fusionsgen sein Startcodon und kann von den Zellen nicht mehr exprimiert werden. Das *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym β -Galactosidase, welches die Umsetzung des Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) in Galactose und einen blauen Indigofarbstoff katalysiert. Da die transgenen Zelllinien das Enzym β -Galactosidase nicht mehr synthetisieren, weisen sie nach Zugabe von X-Gal keine Blaufärbung auf, während sich die nicht transfizierte Ausgangszelllinie blau färbt.

Für den *lacZ*-Test wurden sowohl die transgenen Zelllinien als auch die nicht transfizierte Ausgangszelllinie, welche als Positivkontrolle für die Färbung verwendet wurde, in einer 24-Well-Platte bis zu einer Konfluenz von circa 60 % kultiviert. Die Zellen wurden zunächst mit 0,5 ml DPBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml Fixierlösung bei Raumtemperatur 10 min fixiert. Im Anschluss daran wurde die Fixierlösung mit einer Vakuumpumpenapparatur abgesaugt und die Zellen erneut mit 0,5 ml DPBS gewaschen. Nach Zugabe von 0,5 ml Färbelösung wurden die Zellen 2,5 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und schließlich im Inversmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss NV-SA, Carl Zeiss Jena) auf Blaufärbung überprüft. Nur Zelllinien, welche weniger als 5 % blau gefärbte Zellen aufwiesen, wurden für die Experimente ausgewählt.

Auch mit den mES-Zellen wurde ein *lacZ*-Test durchgeführt, da diese Zellen ein auf einem der beiden Allele des *Ube3a*-Gens in Intron 4 integriertes *lacZ*-Gen besitzen. Der *lacZ*-Test wurde während der neuronalen Differenzierung (siehe Kapitel 2.2.3) durchgeführt, um die Inaktivierung einer der beiden Genkopien nachzuweisen. Wie oben beschrieben, wurden die Zellen zunächst fixiert und anschließend gefärbt. Da die Zellen für die Färbung jedoch in

6cm-Zellkulturschalen kultiviert wurden, erfolgte die Fixierung und Färbung mit jeweils 2 ml Lösung.

2.2.9 Doxycyclin-Behandlung der transgenen Zelllinien

Für die Doxycyclin-Behandlung transgener Flp-In™-T-REx™-293-Zelllinien wurden die Zellen zunächst in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:20 passagiert und dabei in je zwei 75cm²-Zellkulturflaschen bzw. jeweils zwei Vertiefungen von zwei 6-Well-Platten ausgesät. Circa 24 Stunden später wurde mit der Doxycyclin-Behandlung der Zellen begonnen. Dazu wurde das Medium in einer der beiden 75cm²-Zellkulturflaschen bzw. in zwei Vertiefungen einer 6-Well-Platte durch Selektionsmedium mit 1 µg/ml Doxycyclin ersetzt. Die andere Hälfte der Zellen diente als Kontrolle und wurde weiterhin in Selektionsmedium ohne Doxycyclin kultiviert. Das Selektionsmedium enthielt bei den in Kapitel 3.2.7, 3.2.8.1 und 3.2.9.1 beschriebenen Experimenten das *Fetal Bovine Serum, qualified, E.U.-approved, South America origin*. Für die Experimente in Kapitel 3.2.8.2, 3.2.9.2 und 3.2.10 wurde *Fetal Bovine Serum, certified, US origin* verwendet, welches vom Hersteller als Tetracyclin-frei deklariert wurde. Das Medium wurde täglich erneuert und die Zellen auf diese Weise 24 Stunden bis 14 Tage kultiviert. Nach drei, sieben, zehn und 14 Tagen wurden sowohl die Kontrollen als auch die mit Doxycyclin behandelten Zellen passagiert und die restlichen Zellen 4 min bei 200 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment für die Extraktion von RNA und DNA verwendet. Die ausschließlich für 24 Stunden mit Doxycyclin behandelten Zellen und ihre Kontrollen wurden nicht passagiert, sondern vollständig bei 200 x g für 4 min sedimentiert. Die Zellsedimente wurden anschließend ebenfalls für die RNA- und DNA-Extraktion verwendet.

2.2.10 Kryokonservierung der Zellen

Für die Kryokonservierung wurde zunächst das Medium von den adhärent wachsenden Zellen abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, mit 0,05 % Trypsin-EDTA abgelöst und in 10 ml Medium resuspendiert. Durch Zentrifugation bei 200 x g für 4 min wurden die Zellen sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß für die Kryokonservierung überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen zunächst in einer Styroporbox bei -80 °C für mindestens 24 Stunden aufbewahrt, bevor sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt und dort langfristig gelagert wurden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolation von Nukleinsäuren

2.3.1.1 Simultane Isolation genomischer DNA und RNA

Für die simultane Isolation von genomischer DNA und RNA aus demselben Ansatz kultivierter Zellen wurde das *AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Präparation der DNA und RNA erfolgte aus circa 2×10^6 sedimentierten Zellen, welche in 600 µl Puffer RLT mit 1 % 2-Mercaptoethanol resuspendiert und auf eine *QIAshredder*-Säule (Qiagen) überführt wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt von 2 min bei 14000 rpm (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg) wurde das homogenisierte Zelllysate bei -80 °C zunächst eingefroren. Für die Präparation der genomischen DNA und RNA wurden die Zelllysate zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und im Anschluss daran die Präparation der DNA und RNA gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zum Schluss wurde die RNA in 30 µl H₂O eluiert, die DNA-Elution erfolgte in 100 µl Elutionspuffer.

2.3.1.2 Isolation von RNA

Sollte ausschließlich RNA aus einem Ansatz kultivierter Zellen isoliert werden, so wurde die Isolation entweder mit dem *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) oder mit *TRIzol®* (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

Das *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) zur Isolation von RNA wurde gemäß Empfehlung des Herstellers verwendet. Wie bereits in Kapitel 2.3.1.1 beschrieben wurden circa 2×10^6 kultivierte, sedimentierte Zellen in 600 µl Puffer RLT mit 1 % 2-Mercaptoethanol resuspendiert und auf eine *QIAshredder*-Säule (Qiagen) aufgetragen. Der Ansatz wurde 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf) und das homogenisierte Zelllysate anschließend bis zur Durchführung der RNA-Extraktion bei -80 °C gelagert. Die Präparation der RNA erfolgte schließlich nach dem Auftauen der Ansätze bei 37 °C im Wasserbad, inklusive des optionalen DNaseI-Verdaus gemäß beiliegendem Protokoll des Herstellers. Die RNA wurde in 30 µl H₂O eluiert.

Die RNA-Isolation mit *TRIzol®* (Thermo Fisher Scientific) wurde gemäß Empfehlung des Herstellers mit circa 6×10^6 kultivierten Zellen durchgeführt. Am Ende wurde die RNA in 30 µl H₂O gelöst und gegebenenfalls bei vorhandenen Verunreinigungen erneut aufgereinigt. Dazu wurde das Volumen der RNA-Lösung mit H₂O auf 300 µl ergänzt und 300 µl

Roti®-Aqua-P/C/I (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1, Carl Roth) hinzugegeben. Der Ansatz wurde durch Vortexen gemischt und 5 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, hierzu wurden 250 µl Chloroform gegeben und der Ansatz durch Vortexen gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 14000 rpm und 4 °C (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf) wurde wiederum die obere Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 100 % Isopropanol. Der Ansatz wurde durch Vortexen gemischt, 60 min bei -20 °C inkubiert und 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf). Nach Abnahme des Überstandes wurde das RNA-Präzipitat mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen, der Ansatz 5 min bei 14000 rpm und 4 °C (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand anschließend vollständig abgenommen. Das RNA-Präzipitat wurde an der Luft getrocknet und in 30 µl H₂O gelöst.

2.3.1.3 Isolation genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit dem *FlexiGene DNA Kit* (Qiagen), wenn keine RNA aus demselben Ansatz benötigt wurde. Zunächst wurden die sedimentierten Zellen in DPBS resuspendiert und 1 - 2 x 10⁶ Zellen in 1 ml DPBS zur Isolation der genomischen DNA eingesetzt. Nach Zugabe von 2,5 ml Puffer FG1 zu 1 ml Zellsuspension, wurde der Ansatz 15 min mithilfe eines Rollenmischers (SRT9, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) gemischt und die Zellen dabei lysiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 3000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde in 500 µl Proteinase K enthaltendem Puffer FG2 resuspendiert, kurz durch Vortexen gemischt und 15 min bei 56 °C und 850 rpm im Thermomixer (Thermomixer comfort 5355, Eppendorf) inkubiert. Durch Zugabe von 500 µl 100 % Isopropanol, Invertieren des Reaktionsgefäßes und Zentrifugation bei 2000 x g für 2 min wurde die DNA präzipitiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand abgenommen und das DNA-Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen. Der Ansatz wurde erneut 2 min bei 2000 x g zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das DNA-Präzipitat an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 300 µl Puffer FG3 wurde die DNA zunächst 1 h bei 65 °C und 850 rpm im Thermomixer (Thermomixer comfort 5355, Eppendorf) inkubiert und schließlich über Nacht bei Raumtemperatur mithilfe des Rollenmischers (SRT9, Bibby Scientific Limited) vollständig gelöst.

2.3.1.4 Isolation von Plasmid-DNA

Für die Präparation kleiner Mengen an Plasmid-DNA wurden 3 ml LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt, mit einer einzelnen klonalen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator (*G25 Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific, Nürtingen) inkubiert. Am folgenden Tag wurden 1,5 ml der Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt, die Zellen 20 s bei 14000 rpm (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 300 µl auf 4 °C gekühltem Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert und der Ansatz nach Zugabe von 300 µl Puffer P2 (Qiagen) durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Während der nachfolgenden Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurden die Zellen lysiert und die Reaktion direkt im Anschluss durch Zugabe von 300 µl Puffer P3 (Qiagen) gestoppt. Durch erneutes mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde der Ansatz gut gemischt und 10 min bei 13000 rpm (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, zu 500 µl 100 % Ethanol gegeben und der Ansatz mittels Vortexen gemischt. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf) für 10 min wurde die DNA präzipitiert und der Überstand anschließend abgenommen. Das DNA-Präzipitat wurde mit 150 µl 70 % Ethanol gewaschen und der Überstand nach einem weiteren Zentrifugationsschritt vollständig abgenommen. Zuletzt wurde das DNA-Präzipitat getrocknet und in 30 µl H₂O aufgenommen.

Die Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab erfolgte mit dem *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers mit 250 ml oder 500 ml Übernachtskultur. Das DNA-Präzipitat wurde in 200 – 600 µl TE-Puffer gelöst.

2.3.2 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA in Lösung erfolgte photometrisch mit dem *NanoDrop 1000* bzw. *2000* UV/Vis-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific). Mithilfe dieses Gerätes wird die optische Dichte (OD) der DNA- bzw. RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm, 280 nm und 230 nm ermittelt. Eine optische Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Durch Bildung der Quotienten OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} können Verunreinigungen der DNA- bzw. RNA-Lösung bestimmt werden. Für reine DNA liegt der Wert des Quotienten OD_{260}/OD_{280} bei 1,8 sowie für reine RNA bei 2,0. Ist der ermittelte Wert niedriger, so liegen möglicherweise Verunreinigungen mit Proteinen, Phenol oder anderen Substanzen, die bei circa 280 nm absorbieren, vor. Verunreinigungen

mit Substanzen, deren Absorptionsmaximum sich bei circa 230 nm befindet, werden durch den Quotienten OD_{260}/OD_{230} bestimmt. Für reine DNA und RNA liegt der Wert zwischen 2,0 und 2,2.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die gezielte Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) von genomischer DNA, Plasmid-DNA sowie mit Bisulfit behandelter DNA. Dafür wurde die *AmpliTaq-Gold®*-DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific), das *HotStarTaq Master Mix Kit* (Qiagen), das *Advantage® GC 2 PCR Kit* (Clontech) sowie der *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) und die *Phusion-High-Fidelity-DNA-Polymerase* (Thermo Fisher Scientific) gemäß den Empfehlungen der Hersteller verwendet. Die PCR umfasste in der Regel 25 - 35 Zyklen, wobei jeder Zyklus in drei Phasen eingeteilt werden kann: die Denaturierung, die *Primer*-Hybridisierung und die Strangverlängerung. Während der Denaturierungsphase wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge getrennt, sodass die *Primer* in der nachfolgenden *Primer*-Hybridisierungsphase an die DNA-Einzelstränge binden können. Dabei richtet sich die Temperatur der *Primer*-Hybridisierungsphase nach der jeweiligen Anlagerungstemperatur der *Primer* (T_A). Sie wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$T_A = 69,3 + 41 \cdot \frac{G+C}{n} - \frac{650}{n}$$

G+C: Anzahl der Guanin- und Cytosinbasen des Oligonukleotids
n: Gesamtlänge des Oligonukleotids

(Chester und Marshak 1993).

Da laut Herstellerangaben die optimale Anlagerungstemperatur eines *Primer*-Paares beim Einsatz der *Phusion*-DNA-Polymerase signifikant von dem, mit dieser Formel berechneten, Wert abweichen kann, wurden die *Primer*-Anlagerungstemperaturen für die Reaktionen mit der *Phusion*-DNA-Polymerase mit dem *Tm Calculator* des Herstellers auf folgender Webseite bestimmt:

<https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>.

Während der Strangverlängerungsphase kommt es schließlich durch den Einbau von Nukleotiden durch die DNA-Polymerase zur Verlängerung der angelagerten *Primer*. Die Dauer der Strangverlängerungsphase ist dabei abhängig von der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts und der Effizienz der eingesetzten DNA-Polymerase. Die Dauer der Strangverlängerungsphase wurde daher gemäß Herstellerangaben angepasst.

2.3.4 Reverse Transkription von RNA

Die reverse Transkription von RNA in cDNA erfolgte aus Gesamt-RNA der Flp-In™-T-REx™-293-Zellen. Um DNA-Kontaminationen in den nachfolgenden Reaktionen zu vermeiden, wurde zunächst ein DNase-Verdau mit dem *RQ1 Kit* (Promega) durchgeführt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an RNA (in der Regel 5 µg) mit 1 U *RQ1 RNase-Free DNase* pro µg RNA in 1 x *RQ1-Reaktionspuffer* und einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die *RQ1-DNase* durch die Zugabe von 2 µl Stopplösung und Inkubation für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Die reverse Transkription erfolgte mit 10 µl des *RQ1-Reaktionsansatzes*, 3 mM MgCl₂, je 1 mM dNTPs, 2,5 µM Oligo d(T)₁₆, 1 U/µl RNase-Inhibitor und 2,5 U/µl MuLV reverse Transkriptase in 1 x *GeneAmp®* PCR-Puffer II (alle Reaktionsbestandteile wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen) und einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Zusätzlich dazu wurde eine Kontrolle ohne die Zugabe des Enzyms MuLV reverse Transkriptase angesetzt. Die *Primer*-Hybridisierung erfolgte für 10 min bei 21 °C, die Strangverlängerung für 15 min bei 42 °C und die Denaturierung für 5 min bei 99 °C.

2.3.5 Quantitative Real-Time PCR

Mithilfe der quantitativen *Real-Time* PCR (qRT-PCR, engl. *quantitative real-time PCR*) kann die relative Ausgangsmenge eines RNA-Transkripts in einem Ansatz bestimmt werden. Die Quantifizierung beruht auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und erfolgt mithilfe einer Sonde, an deren 5'-Ende ein Reporter-Fluorophor und an deren 3'-Ende ein sogenannter *Quencher* kovalent gebunden sind. Nach der reversen Transkription der RNA in cDNA und ihrer Denaturierung in Einzelstränge, binden die *Primer* sowie die Sonde sequenzspezifisch an die cDNA-Einzelstränge. Wird der Reporter angeregt, so kommt es zu einem strahlungsfreien Energietransfer auf den *Quencher* und damit zur Fluoreszenzlöschung, da sich Reporter und *Quencher* in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Dies ändert sich jedoch während der Strangverlängerungsphase, da die Sonde durch die 5'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut wird und Reporter und *Quencher* durch diesen Vorgang voneinander getrennt werden. Es kommt nicht mehr zum strahlungsfreien Energietransfer und die Fluoreszenz des Reporters kann nun detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal steigt daher proportional zur abgebauten Sonde und den dabei entstehenden PCR-Produkten an. Überschreitet das gemessene Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert, so wird der entsprechende PCR-Zyklus als Cp-Wert (engl. *crossing point*) angegeben. Die Detektion des Fluoreszenzsignals kann somit zur Quantifizierung der relativen Ausgangsmenge eines bestimmten RNA-Transkripts genutzt

werden. Dabei werden die Ergebnisse relativ zu denen eines Haushaltsgens angegeben, bei dem es sich in der vorliegenden Arbeit um *GAPDH* handelt.

Die qRT-PCR erfolgte nach der reversen Transkription der RNA in cDNA (siehe Kapitel 2.3.4) mit 2 - 5 µl cDNA, je 0,4 µM *Forward-* bzw. *Reverse-Primer* und 0,2 µM Sonde in 1 x *LightCycler® 480 Probes Master* (Roche Diagnostics) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Dabei wurden 227 ng cDNA entsprechend der Ausgangsmenge an RNA eingesetzt. Die PCR-Reaktion und Messung des Fluoreszenzsignals wurde vollautomatisch mit dem *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche Diagnostics) durchgeführt und umfasste 50 Zyklen. Vor dem ersten Zyklus erfolgte eine initiale Denaturierungsphase bei 95 °C für 10 min. Die nachfolgenden Zyklen beinhalteten eine Denaturierungsphase bei 95 °C für 10 s, eine *Primer*-Hybridisierungsphase bei 60 °C für 30 s und einer Strangverlängerungsphase bei 72 °C für 1 s. Zuletzt folgte eine finale Strangverlängerungsphase bei 40 °C für 30 s. Die Daten wurden anschließend anhand einer Standardkurve, wie im Handbuch der Firma Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific beschrieben (*Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf), ausgewertet.

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

2.3.6.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Der Nachweis von PCR-Produkten und Produkten von Restriktionsendonukleaseverdauen erfolgte durch Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe in Flachbettgelen. Abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Gele aus 0,5 - 2 % Agarose in 1 x TAE-Puffer und 0,4 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurde die DNA-Lösung mit 1 x DNA-Ladepuffer (Thermo Fisher Scientific) versetzt und neben einem Größenstandard (siehe Kapitel 2.1.4) zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen auf das Agarose-Gel geladen. Im Anschluss daran wurden die DNA-Fragmente bei 80 - 130 V in 1 x TAE-Puffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Modell H5, Serie 1087, Bethesda Research Laboratories) aufgetrennt. Die Detektion der DNA-Fragmentgrößen erfolgte anhand des Größenstandards mittels UV-Transilluminator (Bachofer, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm.

2.3.6.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Abweichend zur analytischen Agarose-Gelelektrophorese wurden hierbei die spezifischen DNA-Fragmente mithilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und damit von anderen

DNA-Fragmenten und Bestandteilen des Reaktionsansatzes getrennt. Zur Vermeidung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA wurden beim Ausschneiden der DNA-Fragmente lange UV-Belichtungszeiten vermieden. Im Anschluss daran wurden die Gelstücke über Nacht bei -20 °C eingefroren und die DNA-Fragmente am nächsten Tag mittels Gelextraktion (siehe Kapitel 2.3.7) aus dem Gel aufgereinigt.

2.3.7 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung der aus den Agarose-Gelen ausgeschnittenen DNA-Fragmente (siehe Kapitel 2.3.6.2), erfolgte mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) gemäß Empfehlung des Herstellers.

2.3.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten sowie Produkten von Restriktionsendonuklease-verdauen wurde ebenfalls mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.9 Insertion PCR-vervielfältigter DNA-Fragmente in den TOPO-Vektor

PCR-vervielfältigte DNA-Fragmente wurden zunächst in den TOPO-Vektor inseriert. Abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase können PCR-vervielfältigte DNA-Fragmente einen 3'-Überhang aufweisen. Diese DNA-Fragmente wurden mit dem *TA Cloning® Kit* (Thermo Fisher Scientific) gemäß den Angaben des Herstellers in den TOPO-Vektor pCR™2.1 inseriert. Die Ligation wurde mit 2 µl PCR-Produkt (nicht aufgereinigt), 2 µl pCR™2.1-Vektor-DNA sowie 4 U T4-DNA-Ligase in 1 x Ligationspuffer und einem Endvolumen von 10 µl angesetzt und über Nacht bei 14 °C inkubiert.

Die Klonierung von DNA-Fragmenten ohne 3'-Überhang erfolgte mit dem *Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific) in den Vektor pCR™-Blunt II-TOPO® nach Empfehlung des Herstellers. Es wurden 4 µl PCR-Produkt (nicht aufgereinigt) mit 1 µl pCR™-Blunt-II-TOPO®-DNA und 1 µl Salzlösung in einem Endvolumen von 6 µl angesetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Transformation von *E. coli* (siehe Kapitel 2.3.10).

2.3.10 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurde mit den kompetenten *Subcloning Efficiency™ DH5α™* Zellen der Firma Thermo Fisher Scientific, *SURE® 2* superkompetenten Zellen der Firma Agilent Technologies oder mit *Dam⁻/Dcm⁻* kompetenten *E. coli* der Firma

New England Biolabs gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für konventionelle Transformationen wurden die *Subcloning Efficiency*[™] DH5 α [™] kompetenten Zellen verwendet, während die *SURE*[®] 2 superkompetenten Zellen für kompliziertere Klonierungen eingesetzt wurden. Sie besitzen eine besonders hohe Transformationseffizienz und ermöglichen Klonierungen von DNA-Sequenzen, welche Sekundärstrukturen oder invertierte Wiederholungssequenzen umfassen. Dam-/Dcm-kompetente *E. coli* wurden für Transformationen verwendet, die nach der Plasmidaufreinigung aus den Bakterien Plasmide ohne Dam- bzw. Dcm-Methylierung liefern sollten.

2.3.11 Restriktionsendonukleaseverdau

Für die Spaltung von DNA wurden sogenannte Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs verwendet. Diese erkennen spezifische DNA-Sequenzen und spalten die DNA gezielt an einer bestimmten Stelle. Bei optimalen Bedingungen spaltet eine Einheit des jeweiligen Enzyms (1 U) 1 μ g DNA in 1 h. Für die vorliegende Arbeit wurden jeweils 0,5 - 5 μ g DNA, unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Puffers, mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Dafür wurden die Ansätze 1 - 3 h, bei großen DNA-Mengen über Nacht, bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Bei der Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurden die Angaben auf der Webseite des Herstellers (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>) befolgt.

2.3.12 Herstellung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden

Für die Ligation von DNA-Fragmenten (siehe Kapitel 2.3.14) ist es erforderlich, dass diese kompatible Enden aufweisen. Abhängig vom verwendeten Enzym können die DNA-Fragmente nach einem Restriktionsendonukleaseverdau entweder glatte Enden oder Enden mit einem 3'- bzw. 5'-Überhang aufweisen. DNA-Fragmente mit glatten Enden sind kompatibel und können miteinander ligiert werden. Bei DNA-Fragmenten mit einem 3'- bzw. 5'-Überhang trifft dies nur zu, wenn sie mit der gleichen Restriktionsendonuklease gespalten wurden oder zwei Enzyme eingesetzt wurden, die die DNA auf die gleiche Weise schneiden. DNA-Fragmente, welche unterschiedliche Überhänge aufweisen, können nicht miteinander ligiert werden. Sie müssen zunächst in DNA-Fragmente mit glatten Enden umgewandelt werden. Dies kann entweder durch Einzelstrangabbau oder Auffüllen der Überhänge erfolgen. Der Einzelstrangabbau erfolgte durch Zugabe von 1 U *Mung-Bean-Nuklease* (New England Biolabs) pro μ g DNA zum nicht aufgereinigten Ansatz des

Restriktionsendonukleaseverdaus. Nach Inkubation bei 30 °C für 1 h wiesen die DNA-Fragmente kompatible, glatte Enden auf, welche miteinander ligiert werden konnten. Das Auffüllen von 5'-Überhängen wurde mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* (New England Biolabs) durchgeführt. Dazu wurden dem nicht aufgereinigten Ansatz des Restriktionsendonukleaseverdaus 33 mM dNTPs und 1 U Klenow-Fragment pro µg DNA hinzugefügt. Der Ansatz wurde 15 min bei 25 °C inkubiert und die Reaktion anschließend, durch Zugabe von EDTA mit einer Endkonzentration von 10 mM und Inkubation für 20 min bei 75 °C, beendet.

2.3.13 Dephosphorylierung von Vektoren

Vor der Ligation (siehe Kapitel 2.3.14) von DNA-Fragmenten mit glatten Enden ist eine Dephosphorylierung der Vektor-DNA erforderlich. Dabei wird die 5'-Phosphatgruppe der linearisierten Vektor-DNA abgespalten und so die Religation des Vektors verhindert. Dies erleichtert die Insertion eines DNA-Fragments in den Vektor.

Die Dephosphorylierung von 1 µg linearisierter Vektor-DNA erfolgte mit 1 U *FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase* in 1 x Reaktionspuffer (Thermo Fisher Scientific) und einem Endvolumen von 20 µl. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Inkubation für 5 min bei 75 °C beendet.

2.3.14 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von linearisierten DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden erfolgte mithilfe der T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific). Hierfür wurde die Vektor- und Fragment-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 oder 1:5 eingesetzt und diese mithilfe von 5 U T4-DNA-Ligase in 1 x Ligationspuffer (Thermo Fisher Scientific) für 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C miteinander ligiert.

2.3.15 Herstellung des Klonierungslinkers

Weitere Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen wurden mithilfe eines Klonierungslinkers in das pcDNA5/FRT/TO-Ex2/3-Plasmid inseriert. Die beiden, für den Klonierungslinker verwendeten, Oligonukleotide besitzen eine zueinander komplementäre Sequenz mit Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *SmaI*, *KpnI*, *EcoRV* und *BamHI*. Sie wurden unmodifiziert und lyophilisiert von der Firma Biomers bezogen. Gemäß Herstellerangaben wurde mit H₂O eine Stammlösung der Oligonukleotide mit einer Konzentration von 100 µM hergestellt.

Zunächst wurden die Oligonukleotide separat voneinander phosphoryliert. Hierzu wurden 10 µM des jeweiligen Oligonukleotids mit 10 U T4-Polynukleotid-Kinase in 1 x Reaktionspuffer (New England Biolabs) und einem Endvolumen von 20 µl für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch eine 20-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

Die Hybridisierung der Oligonukleotide erfolgte mit je 5 µl der unaufgereinigten Phosphorylierungsansätze und H₂O in einem Endvolumen von 100 µl. Zunächst wurde der Ansatz 3 min auf 95 °C im Thermomixer (*Thermomixer comfort 5355*, Eppendorf) erhitzt und das Gerät im Anschluss daran ausgeschaltet. Der Ansatz wurde bis zum Erreichen der Raumtemperatur (circa 2 h) im Gerät belassen, sodass sich während dieser Zeit Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Oligonukleotiden ausbilden konnten. Anschließend wurde die Konzentration der doppelsträngigen DNA mit dem *NanoDrop 1000* UV/Vis-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Der phosphorylierte, doppelsträngige Klonierungslinker mit glatten Enden konnte danach für die Ligation (siehe Kapitel 2.3.14) in das Plasmid pcDNA5/FRT/TO-Ex2/3 verwendet werden.

2.3.16 Ortsspezifische Mutagenese

Um den inserierten Testpromotor später vom endogenen Promotor der Zelllinie unterscheiden zu können, wurde dieser durch einen spezifischen Basenaustausch markiert. Die Mutagenese wurde mithilfe des *GeneArt® Site-Directed Mutagenesis System* (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Dazu wurden zunächst zwei komplementäre *Primer* gemäß Herstellerangaben gelegt, welche in ihrer Sequenzmitte das modifizierte Nukleotid aufwiesen (siehe Kapitel 8.1.2 Tabelle 10). Die *Primer* wurden von der Firma Biomers bezogen und die Mutagenese-Reaktion sowie die Transformation von *E. coli* laut Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.17 Gibson Assembly

Da die Insertion der Stoppkassette in das Plasmid pBS-*Ube3a_int1_6kb* mittels gewöhnlicher Klonierungsstrategien nicht gelang, wurde alternativ das *Gibson Assembly® Cloning Kit* (New England Biolabs) verwendet. Dafür wurden zunächst *Primer* erstellt, welche zur Vervielfältigung der Stoppkassette genutzt wurden (siehe Kapitel 8.1.1 Tabelle 7). Die *Primer* wurden so gelegt, dass die Stoppkassette nach ihrer Vervielfältigung an ihrem 5'- und 3'-Ende eine Sequenzüberlappung mit der gewünschten Integrationsstelle des Plasmids pBS-*Ube3a_int1_6kb* aufwies. Durch den Einsatz einer 5'-Exonuklease sollten die überlappenden Sequenzen der linearisierten DNA-Fragmente in kompatible Enden

umgewandelt werden und durch eine DNA-Ligase schließlich miteinander verbunden werden.

Die PCR zur Vervielfältigung der Stoppkassette wurde mit dem entsprechenden *Primer*-Paar durchgeführt. Parallel dazu wurde das pBS-*Ube3a*_int1_6kb-Plasmid mittels Restriktionsendonuklease an der gewünschten Integrationsstelle der Stoppkassette gespalten (siehe Kapitel 2.3.11). Beide Reaktionen wurden anschließend mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) aufgereinigt und die *Gibson Assembly* und Transformation von *E. coli* laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.18 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA, PCR-Produkten sowie Bisulfit-konvertierter DNA erfolgte nach der Sanger-Kettenabbruch-Methode mit dem *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific). Hierfür wurden bis zu 500 ng DNA, 0,5 µM *Primer*, 1 µl *BigDye®* sowie 1 µl Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 10 µl angesetzt. Sequenzierungen mit Bisulfit-konvertierter DNA erfolgten mit 4 µl *BigDye®* und ohne die Zugabe von 1 µl Reaktionspuffer. Die Sequenzier-PCR umfasste 25 Zyklen, wobei vor dem ersten Zyklus eine initiale Denaturierungsphase bei 96 °C für 1 min erfolgte. Die Zyklen beinhalteten eine Denaturierungsphase bei 96 °C für 10 s, gefolgt von der *Primer*-Hybridisierungsphase bei der jeweils spezifischen Anlagerungstemperatur für 5 s und einer Strangverlängerungsphase bei 60 °C für 4 min. Nach Beendigung der Reaktion wurde jeder Ansatz durch Zugabe von H₂O auf 20 µl ergänzt und zur Entfernung freier Didesoxynukleotide über Sephadex-Säulen aufgereinigt. Hierfür wurde in die Vertiefungen einer *MultiScreen-HV*-Platte (Merck) Sephadex (GE Healthcare, Solingen) gefüllt und je 300 µl H₂O pro Vertiefung darauf gegeben. Die auf diese Weise hergestellten Sephadex-Säulen wurden mindestens 3 h bei 4 °C inkubiert und vor dem Gebrauch 5 min bei 900 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Sequenzieransätze auf die Sephadex-Säulen gegeben und für 5 min bei 900 x g in eine Sequenzier-Platte (*Thermo-Fast 96 PCR Detection Plate*, Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert. Jedem Ansatz wurden jeweils 10 µl *Hi-Di™* Formamid (Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt bevor die Analyse mit dem *Genetic Analyzer 3130xl* (Thermo Fisher Scientific) erfolgte. Im Anschluss daran wurde die Auswertung der Sequenzen mit den Programmen *Sequencing Analysis v6.0* (Thermo Fisher Scientific) und *Geneious 8.1.5* (Biomatters, Auckland, Neuseeland) durchgeführt.

2.3.19 Bisulfit-Konvertierung

Um den Methylierungsstatus einer spezifischen DNA-Region bestimmen zu können, wird zunächst eine Bisulfit-Behandlung mit der zu untersuchenden DNA durchgeführt. Dabei werden nicht-methylierte Cytosine durch Bisulfit desaminiert und in Uracil umgewandelt, während 5-Methylcytosin aufgrund der Methylgruppe nicht mit Bisulfit reagiert und somit unverändert bleibt. In einer darauffolgenden PCR wird Uracil durch Thymin ersetzt, wodurch sich die PCR-Produkte methylierter und nicht-methylierter DNA-Abschnitte unterscheiden. Diese Sequenzunterschiede können zur Bestimmung des Methylierungsstatus genutzt werden.

Die Bisulfit-Behandlung wurde mit 500 ng DNA und dem *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* (Zymo Research, Freiburg) gemäß Angaben des Herstellers durchgeführt. Am Ende wurde die DNA in 10 µl M-Elutionspuffer eluiert und 1 µl davon in der nachfolgenden PCR eingesetzt. Neben der mit Bisulfit behandelten DNA beinhaltete der PCR-Reaktionsansatz jeweils 0,4 µM *Forward-* bzw. *Reverse-Primer* und 1 x *HotStarTaq Master Mix* (Qiagen) in einem Endvolumen von 25 µl. Bei den eingesetzten *Primern* handelte es sich um Bisulfit-spezifische *Primer*, welche an ihrem 5'-Ende jeweils eine *Forward-* bzw. *Reverse-Primer*-spezifische *Tag*-Sequenz aufweisen. Die PCR umfasste 40 Zyklen, wobei vor dem ersten Zyklus eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 15 min erfolgte. Ein Zyklus bestand aus einer Denaturierungsphase von 30 s bei 95 °C, einer *Primer*-Hybridisierungsphase bei der jeweils spezifischen Anlagerungstemperatur für 30 s und einer Strangverlängerungsphase bei 72 °C für 45 s. Zuletzt folgte eine finale Strangverlängerungsphase bei 72 °C für 10 min. Die PCR-Produkte wurden danach mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die spezifischen DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten (siehe Kapitel 2.3.6.2). Mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) wurde die DNA aus dem Gel aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.7) und in 25 µl H₂O eluiert. Schließlich wurde sie entweder mittels Sanger-Sequenzierung (siehe Kapitel 2.3.18) oder Hochdurchsatz-Bisulfit-Sequenzierung analysiert (siehe Kapitel 2.3.20).

2.3.20 Hochdurchsatz-Bisulfit-Sequenzierung

Nach der in Kapitel 2.3.19 beschriebenen Bisulfit-Konvertierung der DNA wurden die Ansätze für die Hochdurchsatz-Bisulfit-Sequenzierung vorbereitet. Dazu wurde eine sogenannte Re-PCR mit *Primern* durchgeführt, welche spezifisch für die *Tag*-Sequenzen der *Primer* waren, die zuvor für die PCR nach der Bisulfit-Konvertierung verwendeten wurden. Zudem wiesen die *Primer* eine jeweils probenspezifische Identifikationssequenz (MID, engl. *multiplex identifier*) sowie eine Adapter- und Schlüsselsequenz für die Sequenzierung mit

dem 454 GS Junior System (Roche Diagnostics) auf. Der PCR-Ansatz wurde mit 5 µl PCR-Produkt und jeweils 0,2 µM *Forward*- bzw. *Reverse-Primer* in 1 x *HotStarTaq Master Mix* (Qiagen) und einem Endvolumen von 50 µl angesetzt. Nach einer initialen Denaturierungsphase von 15 min bei 95 °C und 45 Zyklen mit jeweils 30 s bei 95 °C und 1 min bei 72 °C folgte eine finale Strangverlängerungsphase bei 72 °C für 10 min. Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.3.6.1) auf eventuell vorhandene *Primer*-Dimere und unspezifische Produkte hin überprüft und gegebenenfalls nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel ausgeschnitten (siehe Kapitel 2.3.6.2) sowie mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.7). Das Volumen des nicht aufgereinigten PCR-Produkts bzw. des Eluats wurde mit H₂O auf 50 µl ergänzt und die Probenvorbereitung von Sabine Kaya am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen fortgesetzt. Hierfür wurde das System *Agencourt® AMPure® XP* (Beckman Coulter, Krefeld) gemäß den Empfehlungen von Roche Diagnostics (*Amplicon Library Preparation Method Manual*) verwendet. Im Anschluss daran wurden die aufgereinigten Produkte gemäß Empfehlung von Roche Diagnostics verdünnt, vereinigt, in einer Emulsions-PCR klonal vervielfältigt (*emPCR Amplification Method Manual - Lib-A*) und mit dem 454 GS Junior System (Roche Diagnostics) sequenziert. Anhand der probenspezifischen Identifikationssequenzen konnten die Produkte anschließend mit dem Programm *Amplifyer* (Rahmann et al. 2013) analysiert werden.

2.3.21 Messung der Luciferaseaktivität

Die Luciferaseaktivitätsmessung wurde zur Bestimmung der Aktivität der ausgewählten Promotorregionen mit dem *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) durchgeführt. Hierfür wurden Flp-In™-T-REx™-293-Zellen zunächst transient mit dem jeweiligen Luciferase-Reporterplasmid (pGL4.10-Testpromotor) sowie dem Luciferase-Kontrollplasmid (pGL4.74) kotransfiziert (siehe Kapitel 2.2.5.1) und die Messung der Luciferaseaktivität 48 Stunden später wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Nach Abnehmen des Mediums wurden die adhärent wachsenden Zellen zunächst mit 100 µl DPBS gewaschen und durch Zugabe von 20 µl *Passive Lysis Buffer* 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur lysiert. Im Anschluss daran erfolgte die Luciferaseaktivitätsmessung laut Angaben des Herstellers vollautomatisch mit dem Luminometer Centro LB 960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad). Nach Zugabe von 100 µl LARII-Substrat zu den Zelllysaten und einer Wartezeit von 2 s, wurde die Aktivität der *Photinus-pyralis*-Luciferase durch eine Lumineszenzmessung für 10 s bei 340 - 630 nm detektiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Substrates *Stop & Glo* und die Bestimmung der *Renilla-reniformis*-

Luciferaseaktivität auf die gleiche Weise. Für jede Promotorregion wurden jeweils fünf technische Replikate bestimmt und die Messung der Luciferaseaktivität auf diese Weise in drei biologischen Replikaten durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Transkriptabbruch der lncRNA *Snhg14* in murinen embryonalen Stammzellen

3.1.1 Auswahl und Klonierung des Homologiefragments zur Insertion der transkriptionellen Stoppkassette

Es wurde angenommen, dass die paternale Kopie des *Ube3a*-Gens durch transkriptionelle Interferenz zwischen *Snhg14*- und *Ube3a*-Transkripten stillgelegt wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte durch Integration einer transkriptionellen Stoppkassette ein vorzeitiger Transkriptabbruch der lncRNA *Snhg14* erzielt werden. Die Integration dieser Stoppkassette sollte durch homologe Rekombination vermittelt werden und in Intron 1 des paternalen *Ube3a*-Gens von murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) erfolgen. Auf diese Weise sollte eine überlappende Transkription von *Snhg14* mit dem *Ube3a*-Promotor auf dem paternalen Allel verhindert und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die *Ube3a*-Transkription untersucht werden.

Der Integrationsort musste hierfür bestimmte Anforderungen erfüllen. Intron 1 des *Ube3a*-Gens ist 11,7 Kilobasen lang und besteht zu 19,9 Prozent aus Wiederholungssequenzen (<https://genome.ucsc.edu/>, *UCSC Genome Browser, Mouse NCBI37/mm9*). Da nicht bekannt war, wo der Transkriptabbruch nach Lesen des Terminationssignals in der Stoppkassette durch die RNA-Polymerase II tatsächlich erfolgen würde, musste der Integrationsort der Stoppkassette in ausreichendem Abstand zum *Ube3a*-Promotor gewählt werden. Zudem sollte er möglichst wenige Wiederholungssequenzen aufweisen, sodass eine gezielte, stabile Integration in das Genom der mES-Zellen mittels homologer Rekombination erfolgen würde.

Gemäß den oben aufgeführten Anforderungen wurde ein Integrationsort mithilfe des *UCSC Genome Browsers* (<https://genome.ucsc.edu/>) ausgewählt, welcher eine Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease *MscI* umfasst und 6,5 Kilobasen stromabwärts von Exon 1 des *Ube3a*-Gens lokalisiert ist (Abbildung 11). Für die Integration in das Genom der mES-Zellen mittels homologer Rekombination, musste die Stoppkassette von Sequenzen flankiert werden, welche homolog zum Integrationsort sind. Nach Auswahl und Klonierung dieser Homologieregion, ermöglichte die *MscI*-Restriktionsschnittstelle die Integration der Stoppkassette in diese Sequenz. Alternativ beinhaltete die ausgewählte Homologieregion auch eine *StuI*-Restriktionsschnittstelle, welche ebenfalls für die

Integration der Stoppkassette genutzt werden konnte. Diese Restriktionsschnittstelle ist 4,6 Kilobasen von Exon 1 des *Ube3a*-Gens entfernt (Abbildung 11).

Die ursprünglich ausgewählte Homologieregion umfasste circa 7,4 Kilobasen, 18,7 Prozent Wiederholungssequenzen und wurde von Restriktionsschnittstellen für die Endonuklease *Bst*YI flankiert (*UCSC Genome Browser, Mouse* NCBI37/mm9, chr7:66,487,964-66,495,340). Das nach zahlreichen Zwischenschritten tatsächlich klonierte Homologiefragment umfasste schließlich nur circa 5,8 Kilobasen mit 15,4 Prozent Wiederholungssequenzen (*UCSC Genome Browser, Mouse* NCBI37/mm9, chr7:66,488,166-66,493,923) (Abbildung 11).

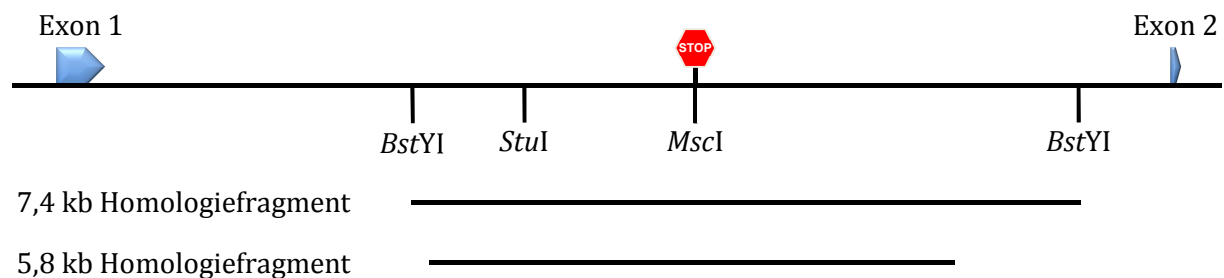


Abbildung 11: Ausschnitt der Genregion von *Ube3a* mit dem geplanten Integrationsort der transkriptionellen Stoppkassette in Intron 1. Im oberen Teil der Abbildung sind Exon 1 und 2 des *Ube3a*-Gens dargestellt (blau). Dazwischen befindet sich Intron 1 mit dem geplanten Integrationsort der Stoppkassette, welcher in Form eines Stoppschildes angegeben ist. Unterhalb davon sind für die Klonierung des Konstruktes relevante Restriktionsschnittstellen, das für die Integration mittels homologer Rekombination geplante Homologiefragment von 7,4 Kilobasen Länge und das tatsächlich klonierte 5,8 Kilobasen lange Fragment abgebildet. Die Abbildung ist maßstabsgetreu entsprechend *UCSC Genome Browser, Mouse* NCBI37/mm9, chr7:66,483,904-66,496,742.

Die Homologieregion sollte zunächst durch Restriktionsendonukleaseverdau aus dem bakteriellen artifiziiellen Chromosom (BAC, engl. *bacterial artificial chromosome*) bMQ253k03 isoliert werden. Hierfür wurde das BAC mit der Restriktionsendonuklease *Bst*YI gespalten und das entsprechende Fragment nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert. Da hierdurch jedoch nur geringe Mengen des gewünschten Produkts isoliert werden konnten und zudem Probleme bei der Ligation in die Klonierungsvektoren auftraten, wurde dieses Vorgehen nicht weiterverfolgt. Stattdessen sollte die Homologieregion mittels PCR vom BAC vervielfältigt werden. Da sich das gesamte 7,4 Kilobasen lange Fragment jedoch nicht vervielfältigen ließ, wurde hierfür eine Region mit 6,9 Kilobasen ausgewählt. Die Homologieregion sollte demnach vom BAC entweder als Fragment mit 6,9 Kilobasen oder in zwei Teilen, als Fragment mit 2,9 und vier Kilobasen, vervielfältigt werden. Die Strategie zur Vervielfältigung der Homologieregion in zwei Teilen zeigte zwar Erfolg, das vier Kilobasen umfassende Fragment ließ sich jedoch nicht vollständig vervielfältigen. Daher umfasste das nach zahlreichen Zwischenschritten

schließlich klonierte Plasmid pBS-*Ube3a_int1_6kb* ein 5,8 Kilobasen langes Homologiefragment zu Intron 1 des *Ube3a*-Gens im Klonierungsvektor pBluescript II KS(+). Die Plasmidkarte ist im Anhang (siehe Kapitel 8.3.1) dargestellt.

3.1.2 Klonierung der transkriptionellen Stoppkassette

Der Transkriptabbruch der lncRNA *Snhg14* sollte durch Integration einer transkriptionellen Stoppkassette in das Genom der mES-Zellen erfolgen. Die hierfür benötigte Stoppkassette wurde freundlicherweise von Dr. D. Barlow (CeMM, Wien) mit dem Plasmid pBS_tkneo511_BGfrt zur Verfügung gestellt. Dieses Plasmid umfasst das partielle Exon 2 sowie das vollständige Intron 2 und Exon 3 des β -Globingens des Kaninchens und dessen Terminationssignal, welches nachweislich zur Termination der Transkription führt (Sleutels et al. 2002). Zudem umfasst das Plasmid das Thymidinkinasegen des *Herpes-simplex*-Virus (*HSV-TK*, engl. *Herpes simplex virus thymidine kinase*) als negativen Selektionsmarker und ein Neomycin-Resistenzgen für die positive Selektion stabil transfizierter Zellen. Im Folgenden werden Exon 2, Intron 2 und Exon 3 sowie das Terminationssignal des β -Globingens, das *HSV-TK*-Gen und das Neomycin-Resistenzgen zusammen als Stoppkassette bezeichnet.

Im Anschluss an die Klonierung des Plasmids pBS-*Ube3a_int1_6kb*, welches das Homologiefragment beinhaltet, sollte die 4,7 Kilobasen lange Stoppkassette in dieses Plasmid inseriert werden. Dazu wurde die Stoppkassette zunächst durch Verdau von pBS_tkneo511_BGfrt mit der Restriktionsendonuklease *SacII* isoliert und sollte daraufhin in die *MscI*- oder alternativ in die *StuI*-Restriktionsschnittstelle des Homologiefragments inseriert werden. Trotz zahlreicher Ligationen, Transformationen und Plasmid-Präparationen blieb dieses Vorgehen jedoch erfolglos. Alternativ wurde das Stoppelement (bestehend aus Exon 2, Intron 2, Exon 3 und dem Terminationssignal) und das Neomycin-Resistenzgen separat mittels PCR vervielfältigt und sollte in zwei Schritten in das Plasmid pBS-*Ube3a_int1_6kb* inseriert werden. Nachdem der Erfolg dieses Vorgehens jedoch ebenfalls ausblieb, wurde die Insertion der Stoppkassette in pBS-*Ube3a_int1_6kb* mittels *Gibson Assembly* geplant. Hierbei sollte entweder das gesamte 4,7-Kilobasen-Fragment oder das Stoppelement und das Neomycin-Resistenzgen separat inseriert werden. Dieses Vorgehen war jedoch ebenfalls nicht erfolgreich.

Während der Klonierungsarbeiten erschien eine Veröffentlichung, die zeigte, dass ein vorzeitiger Abbruch der lncRNA *Snhg14* die Stilllegung des paternalen *Ube3a*-Transkripts tatsächlich verhindert. Hierbei wurde die Stoppkassette zwischen den snoRNAs *Snord115* und dem *Ube3a*-Gen integriert, sodass die lncRNA *Snhg14* nicht mit dem paternalen

Ube3a-Transkript überlappte. Die Studie bestätigte zudem die Hypothese, dass die Expression des paternalen *Ube3a*-Gens durch transkriptionelle Interferenz gehemmt wird (Meng et al. 2013). Daher wurde das im Rahmen dieser Arbeit begonnene Projekt eingestellt.

3.1.3 Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen in neuronale Zellen

Da die Transkription der lncRNA *Snhg14* ausschließlich in neuronalen Zellen mit dem paternalen *Ube3a*-Gen und dessen Promotor überlappt, sollten die mES-Zellen, nach Integration der Stoppkassette, in Neuronen differenziert werden. Die Etablierung der neuronalen Differenzierung erfolgte mit mES-Zellen ohne integrierte Stoppkassette. In Abbildung 12 sind die Zellen zehn Tage nach Beginn der neuronalen Differenzierung zu sehen, als sich bereits erste neuronale Strukturen gebildet hatten. Auf der linken Seite der Aufnahme befindet sich eine neuronale Rosette, welche sich während einer neuronalen Differenzierung typischerweise ausbildet. Aus diesen neuronalen Vorläuferzellen entwickeln sich schließlich reife Neuronen. Die langen fadenförmigen Strukturen sind Dendriten der neuronalen Zellen.

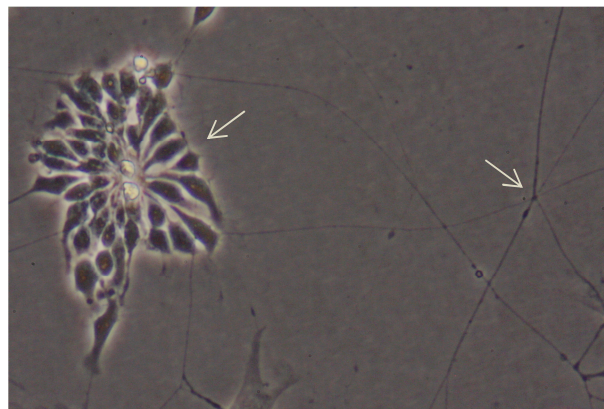


Abbildung 12: Neuronale Differenzierung der mES-Zellen. Die Aufnahme zeigt die mES-Zellen zehn Tage nach Beginn der neuronalen Differenzierung bei 200-facher Vergrößerung (Inversmikroskop AXIOVERT 40, Carl Zeiss Jena). Auf der linken Seite der Aufnahme befindet sich eine neuronale Rosette, welche sich typischerweise während der neuronalen Differenzierung ausbildet und neuronale Vorläuferzellen enthält. Die langen fadenförmigen Strukturen auf der rechten Seite der Aufnahme sind Dendriten der neuronalen Zellen.

Die für die neuronale Differenzierung verwendeten mES-Zellen besitzen in Intron 4 des *Ube3a*-Gens auf einem der beiden Allele ein integriertes *lacZ*-Gen. Da nicht bekannt war, ob sich das *lacZ*-Gen auf dem paternalen oder maternalen Allel der Zellen befindet, wurden während der neuronalen Differenzierung *lacZ*-Tests durchgeführt. In neuronalen Zellen wird *Ube3a* vom paternalen Allel nicht exprimiert. Daher würde man bei einer Integration

des *lacZ*-Gens auf dem paternalen *Ube3a*-Allel ebenfalls keine *lacZ*-Genexpression erwarten. Zellen, die das *lacZ*-Gen exprimieren, färben sich nach der Zugabe des Substrates 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) blau. Bleibt eine Blaufärbung der Zellen nach Zugabe dieses Substrates aus, so wird das *lacZ*-Gen in diesen Zellen nicht exprimiert.

Da sich die undifferenzierten mES-Zellen nach Zugabe von X-Gal blau färbten, wird das *lacZ*-Gen in diesen Zellen exprimiert (Abbildung 13). Nach der neuronalen Differenzierung und einer Behandlung mit X-Gal zeigten die differenzierten Zellen jedoch keine Blaufärbung, was auf eine Inaktivierung der *lacZ*-Genexpression hinweist. Die noch undifferenziert vorliegenden Zellen färbten sich wiederum blau.

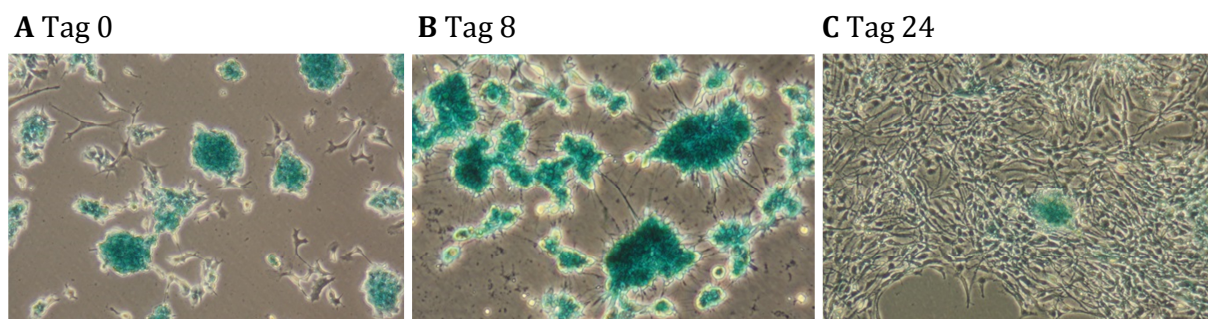


Abbildung 13: Ergebnis der im Verlauf der neuronalen Differenzierung durchgeführten *lacZ*-Tests. Die Abbildung zeigt die mES-Zellen nach Durchführung des *lacZ*-Tests bei 100-facher Vergrößerung. **A** Vor der neuronalen Differenzierung waren die undifferenzierten mES-Zellen in Zellverbänden organisiert und zeigten eine deutliche Blaufärbung nach der Behandlung mit X-Gal. **B** Acht Tage nach Beginn der neuronalen Differenzierung hatten sich bereits neuronale Strukturen zwischen den noch undifferenzierten Zellen ausgebildet. Nach der Behandlung mit X-Gal waren die noch undifferenzierten Zellen erneut blau gefärbt. **C** 24 Tage nach Beginn der neuronalen Differenzierung war ein Großteil der Zellen differenziert. Die ausdifferenzierten Zellen wiesen nach Durchführung des *lacZ*-Tests keine Blaufärbung auf, während die wenigen verbliebenen, undifferenzierten Zellen blau gefärbt waren.

Da das *lacZ*-Gen in den differenzierten Zellen inaktiv zu sein schien, ist davon auszugehen, dass es auf dem paternalen Allel lokalisiert ist und durch die lncRNA *Snhg14* ausgeschaltet wurde. Der *lacZ*-Test würde daher auch den Erfolg der neuronalen Differenzierung nachweisen, da die Inaktivierung der Genexpression auf dem paternalen Allel durch die lncRNA *Snhg14* ausschließlich in neuronalen Zellen erfolgt.

Da das Projekt, welches den Transkriptabbruch der lncRNA *Snhg14* in Intron 1 des *Ube3a*-Gens zum Ziel hatte, eingestellt wurde, wurde die neuronale Differenzierung trotz vielversprechender Ergebnisse nicht weiterverfolgt.

3.2 Etablierung eines induzierbaren Zellkulturmodells zur Untersuchung von TI

3.2.1 Auswahl der Promotorregionen

Zur Untersuchung von TI und ihrer Auswirkung auf beliebige humane Promotoren wurden zunächst geeignete Testpromotoren für die Etablierung des Zellkulturmodells ausgewählt. Da Studien in der Maus zeigten, dass die monoallelische Genexpression von *Ube3a* in Neuronen durch eine mit diesem Gen überlappende Transkription hervorgerufen wird, wurde der Promotor des humanen *UBE3A*-Gens für das Projekt gewählt (Meng et al. 2012; Meng et al. 2013). Die Auswahl der Promotoren *HBA2* und *MSH2* erfolgte anhand von Patientenstudien, die zeigten, dass eine mit den Genen *HBA2* und *MSH2* überlappende Transkription die Inaktivierung der Expression und Methylierung der Promotorregion des jeweiligen Gens verursacht (Tufarelli et al. 2003; Ligtenberg et al. 2009).

Die putativen Promotorregionen von *UBE3A*, *HBA2* und *MSH2* wurden mithilfe des *UCSC Genome Browsers* und Informationen von SwitchGear Genomics (Menlo Park, USA) sowie GeneCopoeia (Rockville, USA) bestimmt. Als Anhaltspunkt für die Auswahl der putativen Promotorregionen diente das Vorkommen von bestimmten Histonmodifikationen. Die Trimethylierung des Histons H3 an Position vier des Lysins (H3K4me3) und die Acetylierung von Histon H3 an Position 27 des Lysins (H3K27ac) sind charakteristisch für aktive Promotoren, während H3K27ac zusammen mit einer Monomethylierung des Histons H3 an Position vier des Lysins (H3K4me1) aktive *Enhancer* kennzeichnet (Barski et al. 2007; Creighton et al. 2010; Shlyueva et al. 2014). Die Angaben der Histonmodifikationen in den nachfolgenden Abbildungen stammen vom ENCODE-Konsortium (engl. *Encyclopedia of DNA Elements Consortium*) und basieren auf sieben verschiedenen Zelllinien. HEK293-Zellen und das Derivat Flp-In™ T-REx™ 293, welches für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendet wurde, gehören jedoch nicht dazu. Die putativen Promotorregionen wurden so ausgewählt, dass sie stromaufwärts des jeweiligen Gens einen Bereich abdecken, in dem ein Großteil der Histonmodifikationen H3K4me1, H3K4me3 und H3K27ac auftritt. Da alle drei Gene eine CpG-Insel besitzen, wurde der Bereich zudem so gewählt, dass ungefähr die Hälfte der CpG-Insel abgedeckt wird. Für *UBE3A* wurde auf diese Weise ein 1020 Basenpaare langer Bereich als Testpromotor ausgewählt (*UCSC Genome Browser, Human GRCh37/hg19, chr15:25,683,963-25,684,982*) (Abbildung 14) und für *MSH2* eine Region von 850 Basenpaaren (*UCSC Genome Browser, Human GRCh37/hg19, chr2:47,629,683-47,630,532*) (Abbildung 15).

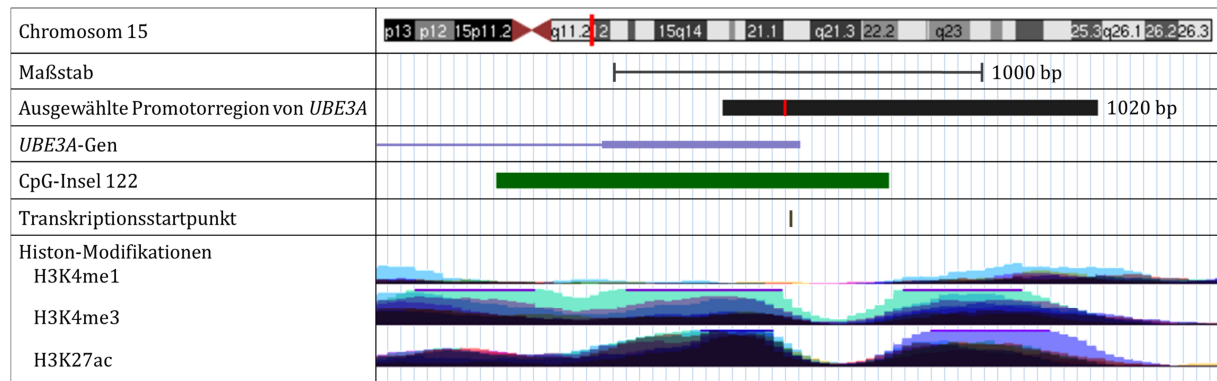


Abbildung 14: Übersicht über die für das *UBE3A*-Gen ausgewählte Promotorregion. Im oberen Teil der Abbildung ist Chromosom 15 mit dem entsprechenden Locus des Testpromotors (roter Strich) und der Maßstab des darunter angegebenen Bereichs gezeigt. Unterhalb davon befindet sich die für *UBE3A* ausgewählte putative Promotorregion, welche 1020 Basenpaare umfasst (schwarzer Balken). Der rote Strich markiert dabei den Basenaustausch, welcher zur Unterscheidung des Testpromotors vom endogenen *UBE3A*-Promotor der Zelllinie genutzt werden kann. Darunter sind Exon 1 und ein Teil von Intron 1 des *UBE3A*-Gens (blau), die CpG-Insel 122 (grüner Balken) und der Transkriptionsstartpunkt (dunkelbrauner Strich) dargestellt. Die unterhalb davon angegebenen Histonmodifikationen H3K4me1, H3K4me3 und H3K27ac beruhen auf Daten von sieben verschiedenen Zelllinien des ENCODE-Projektes. Die Abbildung ist maßstabsgetreu entsprechend *UCSC Genome Browser, Human GRCh37/hg19, chr15:25,683,017-25,685,316*.

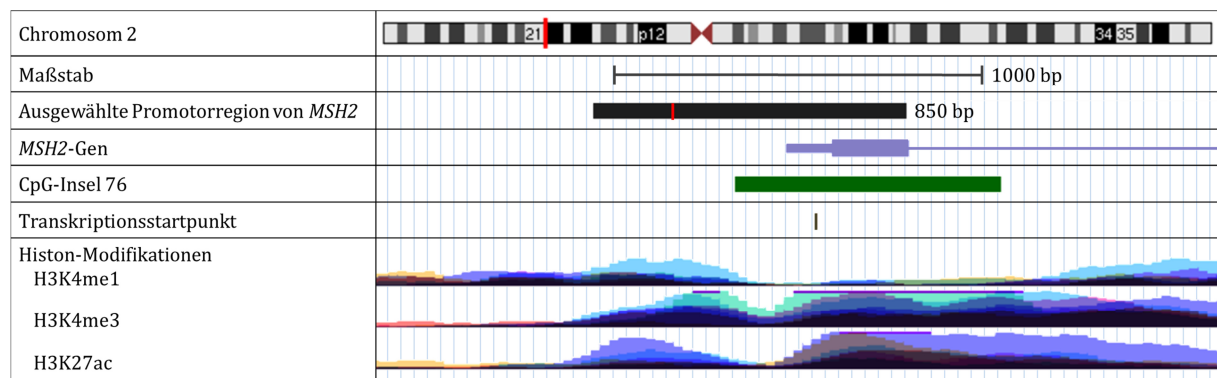


Abbildung 15: Übersicht über die ausgewählte Promotorregion von *MSH2*. Der obere Abschnitt der Abbildung zeigt Chromosom 2 mit dem entsprechend markierten Locus des Testpromotors (roter Strich) und den Maßstab des unterhalb davon angegebenen Bereichs. Die ausgewählte putative Promotorregion des *MSH2*-Gens (schwarzer Balken) ist 850 Basenpaare lang und unterscheidet sich vom endogenen *MSH2*-Promotor der Zelllinie durch eine Base (roter Strich). Darunter sind Exon 1 und ein Teil von Intron 1 des *MSH2*-Gens (blau), die CpG-Insel 76 (grün) und der Transkriptionsstartpunkt (dunkelbrauner Strich) dargestellt. Die in der angegebenen Region vorkommenden Histonmodifikationen H3K4me1, H3K4me3 und H3K27ac sind im unteren Abschnitt der Abbildung gezeigt. Alle Angaben sind maßstabsgetreu gemäß *UCSC Genome Browser, Human GRCh37/hg19, chr2:47,629,092-47,631,391* aufgeführt.

Da nicht bekannt war, ob für den Effekt der TI eventuell die gesamte CpG-Insel erforderlich sein würde und sich die CpG-Insel 108 sogar über einen Großteil des *HBA2*-Gens erstreckt, wurden für *HBA2* zwei Bereiche als Testpromotoren ausgewählt. *HBA2-short* ist 1211 Basenpaare lang und beinhaltet in etwa die Hälfte der CpG-Insel 108 (*UCSC Genome*

Browser, Human GRCh37/hg19, chr16:221,701-222,911), *HBA2-long* ist 1779 Basenpaare lang und schließt die gesamte CpG-Insel 108 ein (UCSC Genome Browser, Human GRCh37/hg19, chr16:221,701-223,479)(Abbildung 16).

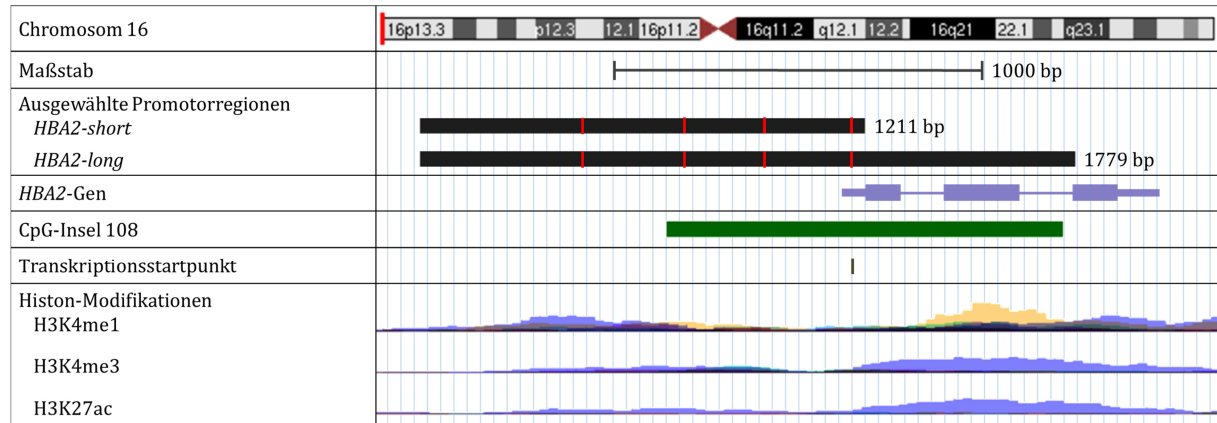


Abbildung 16: Übersicht über die ausgewählten Testpromotoren von *HBA2*. Im oberen Abschnitt der Abbildung ist eine Übersicht über Chromosom 16 mit der entsprechenden Lokalisierung der Testpromotoren (roter Strich) und der Maßstab des darunter angegebenen Bereichs gezeigt. Unterhalb davon befinden sich die für die Etablierung des Zellkulturmodells ausgewählten Testpromotoren (schwarze Balken) mit den zur Unterscheidung vom endogenen Promotor verwendeten Sequenzunterschieden (rote Striche). *HBA2-short* (oberer schwarzer Balken) ist 1211 Basenpaare lang und beinhaltet den putativen Promotor und etwa die Hälfte der CpG-Insel 108 (grüner Balken), *HBA2-long* ist hingegen 1779 Basenpaare lang und umfasst neben dem putativen Promotor auch die gesamte CpG-Insel 108. Diese erstreckt sich über einen Großteil des *HBA2*-Gens (blau). Darunter sind der Transkriptionsstartpunkt (dunkelbrauner Strich) und das Vorkommen der Histonmodifikationen H3K4me1, H3K4me3 und H3K27ac im angegebenen Bereich dargestellt. Die Informationen sind maßstabsgetreu gemäß UCSC Genome Browser, Human GRCh37/hg19, chr16:221,580-223,879 angegeben.

3.2.2 Klonierung der Konstrukte für die Promotoraktivitätsanalyse

Die für die Etablierung des Zellkulturmodells ausgewählten putativen Promotorregionen wurden zunächst mit flankierenden 5'-*Xho*I- und 3'-*Bam*HI-Restriktionsschnittstellen vervielfältigt. Dabei wurde für die Vervielfältigung der putativen Promotoren der Gene *UBE3A* und *MSH2* genomische DNA der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 verwendet, während für die Vervielfältigung der *HBA2*-Promotorregionen Plasmid-DNA eingesetzt wurde. Das humane Hämoglobin-Gen *HBA2* und sein Promotor besitzen eine hohe Sequenzübereinstimmung mit anderen im Genom vorkommenden Hämoglobin-Genen, was die Vervielfältigung der Promotorregionen von genomischer DNA erschwerte. Daher wurden die Sequenzen *HBA2-short* und *HBA2-long* vom Plasmid pZErO-*HBA4kbXho*I vervielfältigt, welches den *HBA2*-Promotor sowie das gesamte *HBA2*-Gen beinhaltet und freundlicherweise von Dr. C. Tufarelli (School of Medicine, Royal Derby Hospital, Derby, UK) zur Verfügung gestellt wurde.

Die PCR-Produkte wurden, abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase, in den pCR™-Blunt II-TOPO®- oder pCR™2.1-Expressionsvektor inseriert und die Integrität der klonierten Promotoren durch Sanger-Sequenzierung überprüft. Um in der später durchgeführten Methylierungsanalyse den jeweiligen Testpromotor vom endogenen Promotor der Zelllinie unterscheiden zu können, wurde entweder durch ortsspezifische Mutagenese ein einzelner Basenaustausch vorgenommen oder es wurden Fragmente verwendet, die bereits Sequenzunterschiede aufwiesen.

Für den *MSH2*-Testpromotor wurde daher mit ortsspezifischer Mutagenese ein Basenaustausch, entsprechend dem natürlich vorkommenden SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*) rs1863332, durchgeführt. Da es in der Sequenz des *UBE3A*-Promotors kaum natürlich vorkommende SNPs mit einer Allel-Häufigkeit von mehr als einem Prozent gibt und die ortsspezifische Mutagenese aufgrund der Guanin- und Cytosin-reichen Sequenz nicht erfolgreich war, wurden für den *UBE3A*-Testpromotor zwei verschiedene Sequenzen ausgewählt, die jeweils einen Basenaustausch enthielten, der während der Vervielfältigung der Promotorsequenz entstanden war. Einer der beiden Basenaustausche befindet sich an Position 308 der ausgewählten Sequenz und weist im Vergleich zur genomischen DNA der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 ein Guanin- anstelle eines Adenin-Nukleotids auf (A308G), in einer anderen Sequenz befindet sich an Position 855 ein Thymin- anstelle eines Cytosin-Nukleotids (C855T). Die vervielfältigten Promotorsequenzen des *HBA2*-Gens konnten unverändert für die nachfolgenden Experimente verwendet werden, da sie im Vergleich zur genomischen DNA der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 bereits an fünf Positionen eine unterschiedliche Base aufwiesen. Der jeweilige Basenaustausch war bereits in der Plasmid-DNA-Sequenz vorhanden, welche für die Vervielfältigung der *HBA2*-Promotorregionen verwendet wurde. Es handelt sich dabei um die SNPs rs2541669, rs200340576 sowie rs187887324 und einen Basenaustausch an Position 716/717 der Testpromotorsequenzen. Die Testpromotoren weisen an Position 716/717 ein Thymin- gefolgt von einem Cytosin-Nukleotid auf, während sich in der genomischen DNA der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 an dieser Stelle ein Cytosin- gefolgt von einem Thymin-Nukleotid befindet (C716T, T717C).

Die Aktivität der Testpromotoren sollte mit Luciferase-Reporter-Experimenten getestet werden. Hierfür wurden die Testpromotoren in das pGL4.10-Luciferase-Reporterplasmid inseriert und die erhaltenen Plasmide sequenziert, um eine korrekte Orientierung der Promotorsequenzen im pGL4.10-Luciferase-Reporterplasmid sicherzustellen.

In der nachfolgenden Tabelle sind die beschriebenen, für die vorliegende Arbeit klonierten Plasmide aufgelistet (Tabelle 1). Die zugehörigen Plasmidkarten sind in Kapitel 8.3.2.1, die Sequenzen der Testpromotoren in Kapitel 8.2 des Anhangs angegeben.

Tabelle 1: Übersicht über die für die Promotoraktivitätsanalyse klonierten Plasmide.

Plasmid-Bezeichnung	Beschreibung
pTOPO- <i>UBE3A</i> _WT	<i>UBE3A</i> -Promotor der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 mit flankierender 5'- <i>Xho</i> I- und 3'- <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstelle in pCR™2.1
pTOPO- <i>UBE3A</i> _A308G	<i>UBE3A</i> -Promotor der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 mit Basenaustausch (A308G) und flankierender 5'- <i>Xho</i> I- und 3'- <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstelle in pCR™2.1
pTOPO- <i>UBE3A</i> _C855T	<i>UBE3A</i> -Promotor der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 mit Basenaustausch (C855T) und flankierender 5'- <i>Xho</i> I- und 3'- <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstelle in pCR™2.1
pTOPO- <i>HBA2-short</i> _SNP	<i>HBA2</i> -Promotor der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 mit SNPs (rs2541669, rs200340576, rs187887324), Basenaustauschen (C716T, T717C) und flankierender 5'- <i>Xho</i> I- und 3'- <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstelle in pCR™2.1
pTOPO- <i>HBA2-long</i> _SNP	<i>HBA2</i> -Promotor sowie gesamte CpG-Insel 108 der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 mit SNPs (rs2541669, rs200340576, rs187887324), Basenaustauschen (C716T, T717C) und flankierender 5'- <i>Xho</i> I- und 3'- <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstelle in pCR™-Blunt II-TOPO®
pTOPO- <i>MSH2</i> _WT	<i>MSH2</i> -Promotor der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 mit flankierender 5'- <i>Xho</i> I- und 3'- <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstelle in pCR™-Blunt II-TOPO®
pTOPO- <i>MSH2</i> _SNP	<i>MSH2</i> -Promotor der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 mit SNP (rs1863332) und flankierender 5'- <i>Xho</i> I- und 3'- <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstelle in pCR™-Blunt II-TOPO®
pGL4.10- <i>UBE3A</i> _WT	<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI- <i>UBE3A</i> -Promotorfragment aus pTOPO- <i>UBE3A</i> _WT in <i>Xho</i> I-Restriktionsschnittstelle von pGL4.10
pGL4.10- <i>UBE3A</i> _A308G	<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI- <i>UBE3A</i> -Promotorfragment aus pTOPO- <i>UBE3A</i> _A308G in <i>Xho</i> I-Restriktionsschnittstelle von pGL4.10
pGL4.10- <i>UBE3A</i> _C855T	<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI- <i>UBE3A</i> -Promotorfragment aus pTOPO- <i>UBE3A</i> _C855T in <i>Xho</i> I-Restriktionsschnittstelle von pGL4.10
pGL4.10- <i>HBA2-short</i> _SNP	<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI- <i>HBA2-short</i> -Promotorfragment aus pTOPO- <i>HBA2-short</i> _SNP in <i>Xho</i> I-Restriktionsschnittstelle von pGL4.10
pGL4.10- <i>HBA2-long</i> _SNP	<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI- <i>HBA2-long</i> -Promotorfragment aus pTOPO- <i>HBA2-long</i> _SNP in <i>Xho</i> I-Restriktionsschnittstelle von pGL4.10
pGL4.10- <i>MSH2</i> _SNP	<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI- <i>MSH2</i> -Promotorfragment aus pTOPO- <i>MSH2</i> _SNP in <i>Xho</i> I-Restriktionsschnittstelle von pGL4.10

3.2.3 Aktivität der ausgewählten putativen Promotorregionen

Die Aktivität der ausgewählten putativen Promotorregionen von *UBE3A*, *HBA2* und *MSH2* wurde mithilfe des dualen Luciferase-Reportersystems bestimmt. Hierfür wurde die Zelllinie Flp-InTM T-RExTM 293 mit dem Luciferase-Reporterplasmid, welches den jeweiligen Testpromotor beinhaltet, und dem Luciferase-Kontrollplasmid transient kotransfiziert. Das Reporterplasmid enthält ein aus *Photinus pyralis* stammendes Luciferasegen, welches abhängig vom integrierten Testpromotor exprimiert wird. Als interne Kontrolle diente das kotransfizierte Kontrollplasmid, welches ein aus *Renilla reniformis* stammendes Luciferasegen unter der Kontrolle des konstitutiven *HSV-TK*-Promotors beinhaltet. Aufgrund ihres unterschiedlichen evolutionären Ursprungs, besitzen die *Photinus-pyralis*- und *Renilla-reniformis*-Luciferase unterschiedliche Enzymstrukturen und Substratanforderungen, welche die selektive Unterscheidung ihrer enzymatischen Reaktionen ermöglicht. Die Photonenemission, welche durch die enzymatische Reaktion der jeweiligen Luciferase hervorgerufen wird, korreliert bei ausreichender Substratmenge mit der Expression des Luciferase-Gens und daher mit der Aktivität des jeweiligen Promotors.

Die Aktivität der *Photinus-pyralis*- und *Renilla-reniformis*-Luciferase wurde in drei biologischen Replikaten mit jeweils fünf technischen Replikaten bestimmt. Als Positivkontrollen wurden die Promotoren der Gene *TRPS1* und *HSV-TK* verwendet, welche von Dr. S. Gkalypoudis am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen jeweils in das Luciferase-Reporterplasmid pGL4.10 kloniert wurden.

Die für die Testpromotoren bzw. Positivkontrollen gemessenen Werte wurden mit denen der internen Kontrolle normalisiert. Dadurch wurden potenziell unterschiedliche Transfektionseffizienzen ausgeglichen. Als Negativkontrolle wurde das Experiment jeweils mit dem Reporterplasmid ohne integrierten Testpromotor durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls normalisiert und die auf diese Weise bestimmte Hintergrundaktivität auf eins gesetzt. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse relativ zu dieser Hintergrundaktivität angegeben.

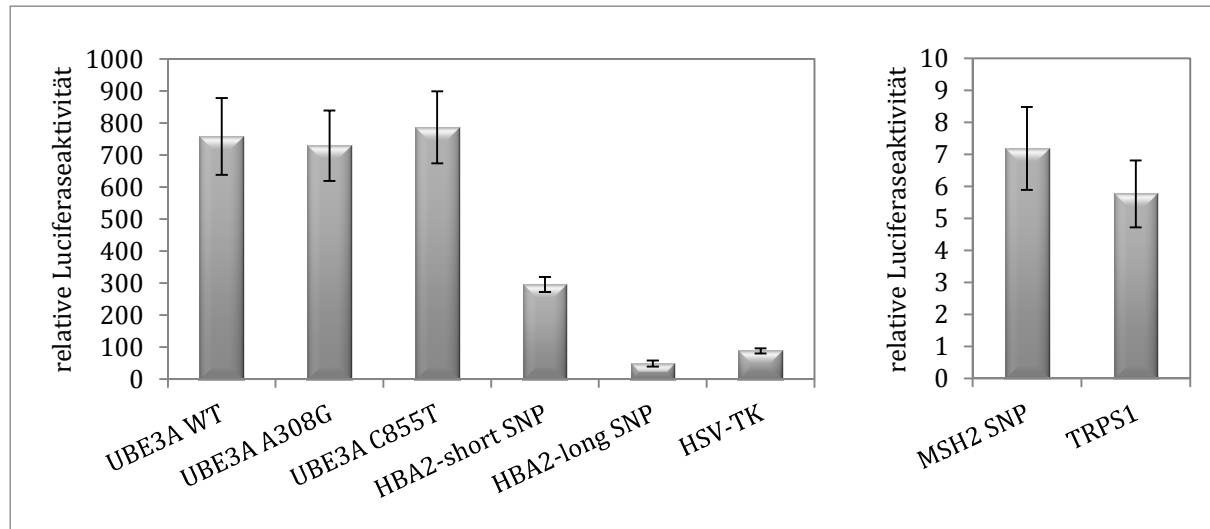


Abbildung 17: Promotoraktivität der ausgewählten putativen Promotorregionen in der transient transfizierten Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293. Die Abbildung zeigt die relative Luciferaseaktivität, welche mithilfe des dualen Luciferase-Reportersystems für die verschiedenen putativen Promotoren von *UBE3A*, *HBA2* und *MSH2* sowie die Positivkontrollen *HSV-TK* und *TRPS1* bestimmt wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass alle ausgewählten Promotorregionen in der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 aktiv sind. Dabei wiesen die verschiedenen *UBE3A*-Promotoren die stärkste Aktivität auf, gefolgt von *HBA2-short*, *HBA2-long* und *MSH2*. Die beiden *UBE3A*-Promotoren, die in ihrer Sequenz einen Basenaustausch besitzen (*UBE3A* A308G und *UBE3A* C855T), zeigten im Vergleich zum Wildtyp-Promotor (*UBE3A* WT) keinen signifikanten Aktivitätsunterschied.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle ausgewählten Promotorregionen in der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 aktiv sind. Für *UBE3A* konnte die stärkste Aktivität nachgewiesen werden, welche deutlich über der Aktivität der Positivkontrolle *HSV-TK* lag. Da für *UBE3A* zwei Testpromotorsequenzen ausgewählt wurden, die einen Basenaustausch aufweisen, der keinem natürlich vorkommenden SNP entspricht, wurde die Aktivität dieser Testpromotoren mit der Aktivität der Wildtyp-Sequenz verglichen. Die beiden *UBE3A*-Promotoren, welche die Sequenzunterschiede A308G und C855T aufweisen (*UBE3A* A308G und *UBE3A* C855T), zeigten dabei im Vergleich zum Wildtyp-Promotor (*UBE3A* WT) keinen signifikanten Aktivitätsunterschied. Für die nachfolgenden Experimente wurde daher die *UBE3A*-Promotorregion ausgewählt, welche sich vom endogenen *UBE3A*-Promotor der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 durch den Basenaustausch C855T unterscheidet. Dieser Basenaustausch liegt im Bereich der CpG-Insel des *UBE3A*-Promotors. Die schwächste Aktivität von allen untersuchten Testpromotoren zeigte der *MSH2*-Promotor mit SNP. Die Aktivität dieses Promotors war vergleichbar mit der Promotoraktivität des *TRPS1*-Promotors, welcher als zweite, schwächere Positivkontrolle verwendet wurde.

Die Promotorregion *HBA2-short*, welche den *HBA2*-Promotor und circa die Hälfte der CpG-Insel 108 umfasst, zeigte im Vergleich zu *HBA2-long*, welche den *HBA2*-Promotor und die gesamte CpG-Insel 108 beinhaltet, eine circa sechsmal höhere Aktivität. Diese lag für

HBA2-short deutlich oberhalb der Aktivität des *HSV-TK*-Promotors, während *HBA2-long* eine geringere Promotoraktivität als diese Positivkontrolle aufwies.

Da die ausgewählten Promotorregionen in der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 aktiv sind, konnten sie für die nachfolgenden Experimente verwendet werden. Im Folgenden werden diese Testpromotoren vereinfacht als *UBE3A* (anstelle von *UBE3A* C855T), *HBA2-short* (anstelle von *HBA2-short* SNP), *HBA2-long* (anstelle von *HBA2-long* SNP) und *MSH2* (anstelle von *MSH2* SNP) bezeichnet.

3.2.4 Wirkung von Doxycyclin auf die Aktivität der ausgewählten Promotoren

Da für die nachfolgenden Experimente eine Behandlung der Flp-In™-T-REx™-293-Zellen mit Doxycyclin erforderlich war, wurde die Wirkung von Doxycyclin auf die ausgewählten Testpromotoren untersucht (Abbildung 18). Hierfür wurde die Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 mit den Luciferase-Konstrukten transient transfiziert und anschließend eine Hälfte der Zellen für 24 Stunden mit Doxycyclin behandelt, während die andere Hälfte der Zellen weiterhin in Medium ohne zugesetztes Doxycyclin kultiviert wurde.

Die Luciferaseaktivität wurde in drei biologischen Replikaten mit jeweils fünf technischen Replikaten bestimmt und die Normalisierung und Kalibrierung der Daten wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben durchgeführt.

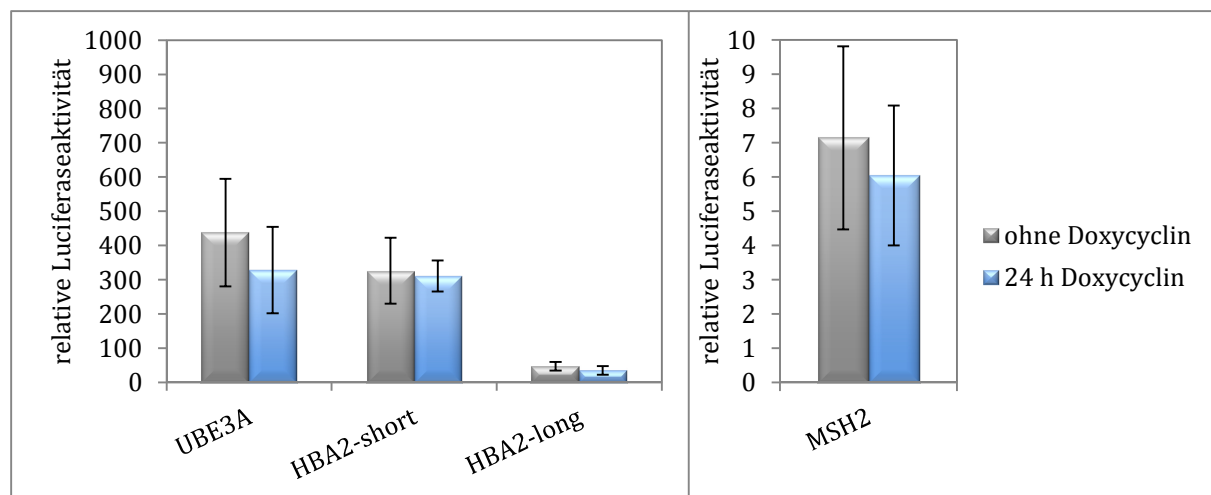


Abbildung 18: Wirkung von Doxycyclin auf die Testpromotoren. Nach der Transfektion mit den Luciferase-Konstrukten wurde eine Hälfte der Flp-In™-T-REx™-293-Zellen für 24 Stunden mit Doxycyclin behandelt, während die andere Hälfte weiterhin in Medium ohne Doxycyclin kultiviert wurde. Die Abbildung zeigt die relative Luciferaseaktivität, welche mithilfe des dualen Luciferase-Reportersystems für die Testpromotoren *UBE3A*, *HBA2-short*, *HBA2-long* und *MSH2* ohne Doxycyclin-Behandlung (grau) und nach 24-stündiger Doxycyclin-Behandlung (blau) der Zellen bestimmt wurde. In den mit Doxycyclin behandelten Zellen wurde im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen kein signifikanter Aktivitätsunterschied für die Testpromotoren bestimmt.

Im Vergleich zu den Ergebnissen im vorangegangenen Kapitel, wurde bei dieser Promotoraktivitätsanalyse eine niedrigere Aktivität für den *UBE3A*-Testpromotor bestimmt, während die Promotoraktivität von *HBA2-short*, *HBA2-long* und *MSH2* mit den Ergebnissen des vorangegangenen Experiments übereinstimmen (siehe Kapitel 3.2.3). Die Aktivität des *UBE3A*-Testpromotors war vergleichbar zu der des *HBA2-short*-Testpromotors und wies damit nicht, wie im vorangegangenen Experiment, mit Abstand die stärkste Aktivität auf. Sowohl für die stärkeren Testpromotoren *UBE3A*, *HBA2-short* und *HBA2-long* als auch für den schwächeren *MSH2*-Testpromotor, konnte kein signifikanter Aktivitätsunterschied in den unbehandelten und mit Doxycyclin behandelten Zellen bestimmt werden. Die Ergebnisse zeigen demnach, dass Doxycyclin keinen signifikanten Aktivitätsunterschied bei den ausgewählten Testpromotoren hervorruft. Somit konnten alle Testpromotoren für die Etablierung des Zellkulturmodells eingesetzt werden.

3.2.5 Klonierung der Konstrukte für das Zellkulturmodell

Nachdem die Aktivität der ausgewählten Promotorregionen bestätigt und eine Auswirkung von Doxycyclin auf die Promotoraktivität ausgeschlossen werden konnte, erfolgte die Klonierung der sogenannten Minigene. Diese umfassen den jeweiligen Testpromotor sowie das Reportergen *EGFP* (engl. *enhanced green fluorescent protein*) und wurden in konvergenter (*Antisense*, AS) oder in Tandem-Orientierung (*Sense*) zu einem weiteren Promotor integriert, welcher die Expression eines zweiten Transkripts kontrolliert. Dieser Promotor ist mit Doxycyclin induzierbar und Teil des humanen Flp-In™-T-REx™-293-Systems, welches für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendet wurde.

Für die Klonierung der Minigene wurden die Testpromotoren in den Vektor *pEGFP_N3* ligiert, welcher die cDNA des Reportergens *EGFP* beinhaltet (Tabelle 2). Anschließend wurden die Minigene aus diesen Plasmiden ausgeschnitten und in den *Basic_Vector* inseriert.

Für die Klonierung dieses *Basic_Vectors* wurde erneut das Plasmid *pBS_tkneo511_BGfrt* verwendet. Wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, beinhaltet dieses Plasmid das partielle Exon 2, das gesamte Intron 2 sowie Exon 3 und das Terminationssignal des β -Globins des Kaninchens, was im Folgenden zusammen als *Exon_2/3* bezeichnet wird. *Exon_2/3* wurde aus diesem Plasmid ausgeschnitten und in den Vektor *pBluescript II KS(+)* ligiert, was in dem Plasmid *pBS-Ex2/3* resultierte. Dieses Plasmid weist eine ausschließlich in Intron 2 vorkommende *HincII*-Schnittstelle auf, die für die Insertion eines Klonierungslinkers genutzt werden konnte. Der Klonierungslinker weist Schnittstellen für

die Restriktionsendonukleasen *Sma*I, *Kpn*I, *Eco*RV sowie *Bam*HI auf und sollte die Integration der Minigene in Intron 2 von Exon_2/3 ermöglichen. Die Integration des Klonierungslinkers in die *Hinc*II-Schnittstelle von pBS-Ex2/3 führte zu dem Plasmid pBS-Ex2/3-linker. Da die Ligation über kompatible, glatte Enden erfolgte, wurde die Orientierung des Klonierungslinkers mittels Sanger-Sequenzierung bestimmt. Anschließend wurde Exon_2/3 zusammen mit dem Klonierungslinker in das Expressionsplasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert, welches den induzierbaren *CMV*-Promotor beinhaltet. Auf diese Weise entstand das Plasmid pcDNA5/FRT/TO-Ex2/3-linker, welches im Folgenden als *Basic_Vector* bezeichnet wird und Exon_2/3 mit dem Klonierungslinker unter der Kontrolle des mit Doxycyclin induzierbaren *CMV*-Promotors enthält (Tabelle 2) (Abbildung 19A).

Tabelle 2: Übersicht über die für das Zellkulturmodell klonierten *EGFP*-Plasmide und die Plasmide zur Herstellung des *Basic_Vectors*.

Plasmid-Bezeichnung	Beschreibung
p <i>EGFP</i> -UBE3A	<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI-UBE3A-Promotorfragment aus pTOPO-UBE3A_C855T in <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstellen von p <i>EGFP</i> _N3
p <i>EGFP</i> -HBA2-short	<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI-HBA2-short-Promotorfragment aus pTOPO-HBA2-short_SNP in <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstellen von p <i>EGFP</i> _N3
p <i>EGFP</i> -HBA2-long	<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI-HBA2-long-Promotorfragment aus pTOPO-HBA2-long_SNP in <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstellen von p <i>EGFP</i> _N3
p <i>EGFP</i> -MSH2	<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI-MSH2-Promotorfragment aus pTOPO-MSH2_SNP in <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI-Restriktionsschnittstellen von p <i>EGFP</i> _N3
pBS-Ex2/3	<i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I-Exon_2/3-Fragment aus pBS_tkneo511_BGfrt in <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I-Restriktionsschnittstellen von pBluescript II KS(+)
pBS-Ex2/3-linker	Klonierungslinker mit Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen <i>Sma</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Eco</i> RV sowie <i>Bam</i> HI in <i>Hinc</i> II-Restriktionsschnittstelle von pBS-Ex2/3
<i>Basic_Vector</i>	<i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I-Exon_2/3-Fragment inklusive Klonierungslinker aus pBS-Ex2/3-linker in <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I-Restriktionsschnittstellen von pcDNA5/FRT/TO

Nach der Klonierung des *Basic_Vectors* wurden die Minigene in dieses Plasmid inseriert. Hierfür wurde der *Basic_Vector* mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RV im Klonierungslinker gespalten und die Testpromotoren zusammen mit dem *EGFP*-Gen in *Sense*- oder *Antisense*-Orientierung zum *CMV*-Promotor inseriert (Abbildung 19).

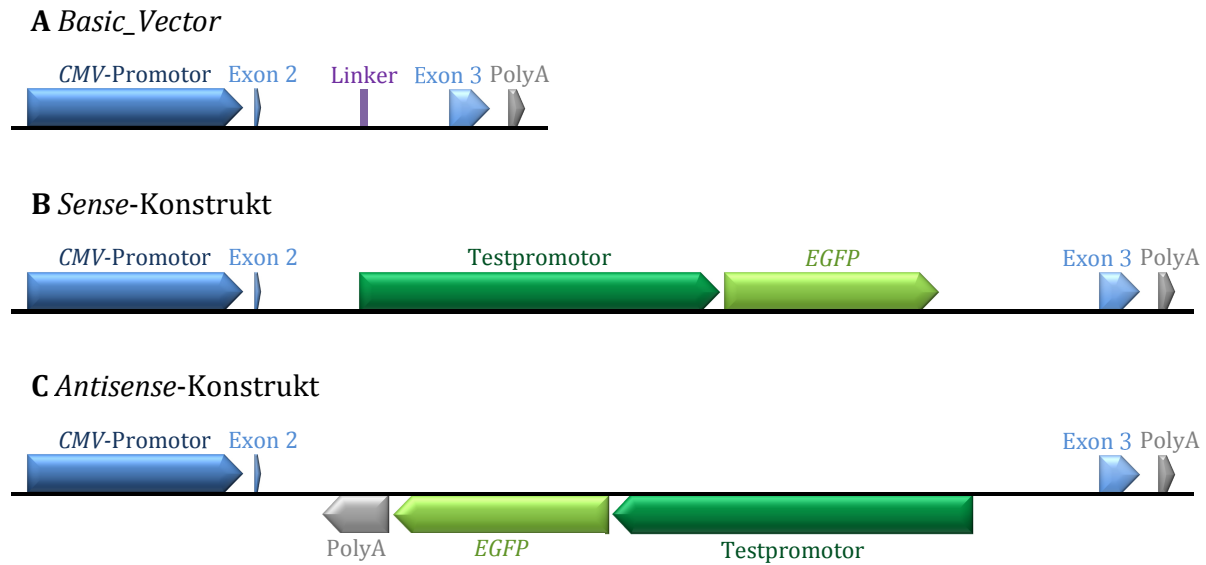


Abbildung 19: Klonierte Konstrukte für die Etablierung des Zellkulturmodells. **A** Der *Basic_Vector* beinhaltet den induzierbaren *CMV*-Promotor (dunkelblau), *Exon_2/3* (hellblau) mit dem integrierten Klonierungslinker (violett) und ein Terminationssignal (grau). **B** Bei den *Sense*-Konstrukten wurde in den *Basic_Vector* der jeweilige Testpromotor (dunkelgrün) und das Reportergen *EGFP* (hellgrün) in Intron 2 von *Exon_2/3* inseriert. Der Testpromotor ist dabei in *Sense*-Orientierung zum induzierbaren *CMV*-Promotor angeordnet. **C** Die *Antisense*-Konstrukte umfassen ebenfalls den jeweiligen Testpromotor und das Reportergen *EGFP* in Intron 2 von *Exon_2/3* des *Basic_Vectors*, allerdings in *Antisense*-Orientierung zum *CMV*-Promotor. Zusätzlich dazu befindet sich ein Terminationssignal (grau) stromabwärts des *EGFP*-Gens.

Für die Klonierung der *Sense*-Konstrukte wurden die Testpromotoren und das *EGFP*-Gen mithilfe der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *XbaI* aus dem Vektor *pEGFP_N3* ausgeschnitten und mittels *Mung-Bean*-Nuklease kompatible, glatte Enden für die Klonierung in den *Basic_Vector* erzeugt. Nach der Ligation, Transformation und Präparation der Plasmid-DNA wurden Plasmide ausgewählt, welche den Testpromotor in *Sense*-Orientierung zum *CMV*-Promotor integriert hatten (Abbildung 19B). Dies führte zu den Plasmiden *pcDNA5/FRT/TO-Testpromotor_Sense* (Tabelle 3). Für die *Antisense*-Konstrukte wurde neben den Testpromotoren und dem *EGFP*-Gen auch das stromabwärts des *EGFP*-Gens gelegene Terminationssignal aus dem Vektor *pEGFP_N3* mit ausgeschnitten. Der Restriktionsverdau erfolgte dabei mit *XhoI* und *SspI* und führte zu den Plasmiden *pcDNA5/FRT/TO-Testpromotor_AS* (Tabelle 3). Diese haben das Minigen in *Antisense*-Orientierung zum *CMV*-Promotor integriert (Abbildung 19C).

Der Erfolg jedes einzelnen Klonierungsschrittes wurde mittels Restriktionsendonukleaseverdau und anschließender Sanger-Sequenzierung überprüft und bestätigt.

Tabelle 3: Übersicht über die für das Zellkulturmodell klonierten *Sense*- und *Antisense*-Konstrukte.

Plasmid-Bezeichnung	Beschreibung
pcDNA5/FRT/TO-UBE3A_Sense	<i>XhoI/XbaI-UBE3A-EGFP</i> -Fragment aus pEGFP-UBE3A in <i>EcoRV</i> -Restriktionsschnittstelle des <i>Basic_Vectors</i>
pcDNA5/FRT/TO-HBA2-short_Sense	<i>XhoI/XbaI-HBA2-short-EGFP</i> -Fragment aus pEGFP-HBA2-short in <i>EcoRV</i> -Restriktionsschnittstelle des <i>Basic_Vectors</i>
pcDNA5/FRT/TO-HBA2-long_Sense	<i>XhoI/XbaI-HBA2-long-EGFP</i> -Fragment aus pEGFP-HBA2-long in <i>EcoRV</i> -Restriktionsschnittstelle des <i>Basic_Vectors</i>
pcDNA5/FRT/TO-MSH2_Sense	<i>XhoI/XbaI-MSH2-EGFP</i> -Fragment aus pEGFP-MSH2 in <i>EcoRV</i> -Restriktionsschnittstelle des <i>Basic_Vectors</i>
pcDNA5/FRT/TO-UBE3A_AS	<i>XhoI/SspI-UBE3A-EGFP</i> -Fragment aus pEGFP-UBE3A in <i>EcoRV</i> -Restriktionsschnittstelle des <i>Basic_Vectors</i>
pcDNA5/FRT/TO-HBA2-short_AS	<i>XhoI/SspI-HBA2-short-EGFP</i> -Fragment aus pEGFP-HBA2-short in <i>EcoRV</i> -Restriktionsschnittstelle des <i>Basic_Vectors</i>
pcDNA5/FRT/TO-HBA2-long_AS	<i>XhoI/SspI-HBA2-long-EGFP</i> -Fragment aus pEGFP-HBA2-long in <i>EcoRV</i> -Restriktionsschnittstelle des <i>Basic_Vectors</i>
pcDNA5/FRT/TO-MSH2_AS	<i>XhoI/SspI-MSH2-EGFP</i> -Fragment aus pEGFP-MSH2 in <i>EcoRV</i> -Restriktionsschnittstelle des <i>Basic_Vectors</i>

3.2.6 Herstellung stabiler Zelllinien zur Untersuchung überlappender Transkription

Für die Etablierung des Zellkulturmodells wurde das humane Flp-In™-T-REx™-293-System verwendet, welches die gezielte, stabile Integration eines Zielgens in das Genom der Zellen mittels Flp-Rekombinase erlaubt. Durch Kotransfektion mit dem pCSFLPe-Plasmid, welches für die Flp-Rekombinase kodiert und dem jeweiligen Expressionsplasmid, welches das entsprechende Zielgen enthält, wurden die Zellen stabil transfiziert. Die Flp-Rekombinase vermittelt die Rekombination zwischen FRT-Rekombinationsstellen im Genom der Zellen und auf dem Expressionsplasmid pcDNA5/FRT/TO. Nach der Rekombination besitzen die Zellen hierdurch statt einer Zeocin-Resistenz eine Hygromycin-Resistenz, welche für die Selektion stabil transfizierter Zellen genutzt werden kann. Zudem wird durch das Rekombinationsereignis das Leseraster des *lacZ*-Gens der Ausgangszelllinie zerstört, sodass die erfolgreiche Integration des Zielgens mithilfe eines *lacZ*-Tests überprüft werden kann. Nach Zugabe des Substrates X-Gal färbte sich die Ausgangszelllinie blau, während die erfolgreich transfizierten Zelllinien keine Farbänderung zeigten. Auf diese Weise wurden für alle Testpromotoren stabile *Sense*- und *Antisense*-Zelllinien erzeugt.

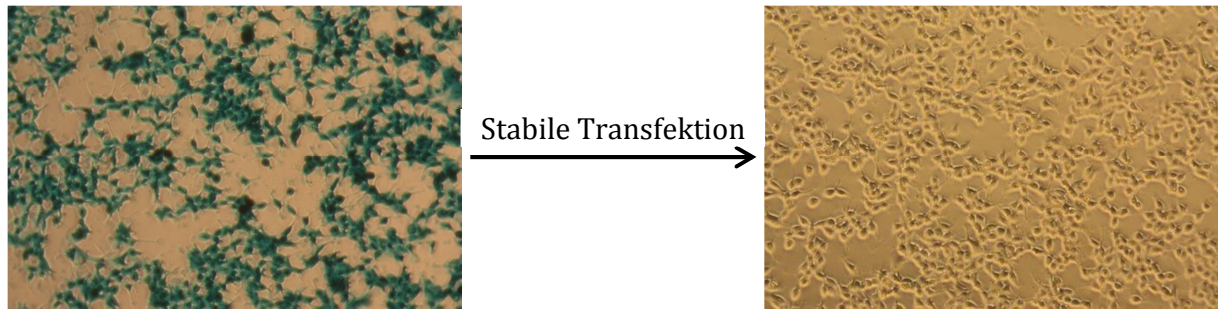


Abbildung 20: *lacZ*-Genexpression in der Ausgangszelllinie und den stabil transfizierten Flp-In™-T-REx™-293-Zellen. Während die Ausgangszelllinie ein aktives *lacZ*-Gen besitzt und nach der Durchführung des *lacZ*-Tests eine deutliche Blaufärbung aufwies (linke Aufnahme), zeigten die stabil transfizierten Zellen keine Farbänderung, da durch das Rekombinationsereignis das Leseraster des *lacZ*-Gens zerstört wurde (rechte Aufnahme). Die rechte Abbildung zeigt repräsentativ Zellen der Zelllinie *HBA2-long_AS* nach Durchführung des *lacZ*-Tests. Beide Aufnahmen wurden bei 100-facher Vergrößerung (Inversmikroskop AXIOVERT 40, Carl Zeiss Jena) gemacht.

Für die nachfolgenden Experimente wurden für die Testpromotoren *UBE3A*, *HBA2-short* und *HBA2-long* drei Zellklone der jeweiligen *Antisense*-Zelllinie ausgewählt. Im Gegensatz dazu erfolgten die mit dem *MSH2*-Testpromotor durchgeführten Experimente mit drei Zellklonen der *Sense*-Zelllinie. Diese Zelllinien wurden für die Experimente ausgewählt, da sie die Situation imitieren, die in Zellen bestimmter Patienten oder Geweben zu einer überlappenden Transkription und einer damit verbundenen Repression der Genexpression führt. Das paternale *UBE3A*-Gen wird in neuronalen Zellen durch die Transkription der lncRNA *SNHG14* in *Antisense*-Richtung überlappt (siehe Kapitel 1.4.1), das *HBA2*-Gen in einem α -Thalassämie-Patienten von dem verlängerten *LUC7L*-Transkript (siehe Kapitel 1.4.2). Bei bestimmten Lynch-Syndrom-Patienten führt ein verlängertes *EPCAM*-Transkript, welches mit dem *MSH2*-Promotor, im Gegensatz zu den anderen beiden Beispielen, in *Sense*-Richtung überlappt, zur Repression der *MSH2*-Genexpression (siehe Kapitel 1.5).

3.2.7 Auswirkungen der überlappenden Transkription auf die EGFP-Proteinexpression

Nach der erfolgreichen Herstellung stabiler Zelllinien wurde in diesen Zellen durch die Zugabe von Doxycyclin der *CMV*-Promotor induziert. Hierdurch sollte die überlappende Transkription der Exon_{2/3}- und *EGFP*-Transkripte hervorgerufen werden. Bei einer daraus resultierenden TI würde eine Reduktion der *EGFP*-Expression und somit eine verminderte Expression des EGFP-Proteins erwartet, was in einer verminderten EGFP-Fluoreszenz resultieren würde.

Um das Vorkommen von Transkripten und EGFP-Proteinen, welche vor dem Induktionszeitpunkt synthetisiert wurden, bei der Analyse möglichst gering zu halten,

erfolgte die erste Analyse der Zellen erst nach dreitägiger Behandlung mit Doxycyclin. Des Weiteren sollten spätere Zeitpunkte Auskunft darüber geben, ob ein eventuell durch die überlappende Transkription hervorgerufener Effekt bei längerer Einwirkung verstärkt würde. Jeweils drei Zellklone einer Zelllinie wurden daher drei, sieben und zehn Tage mit Doxycyclin behandelt und für jeden Zeitpunkt sowie Zellklon eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Die Expression des EGFP-Proteins wurde dabei durch Fluoreszenz-Mikroskopie detektiert. Die aufgenommenen Bilder einer der drei untersuchten Zellklone der Zelllinie *HBA2-short_AS* sind gezeigt (Abbildung 21).

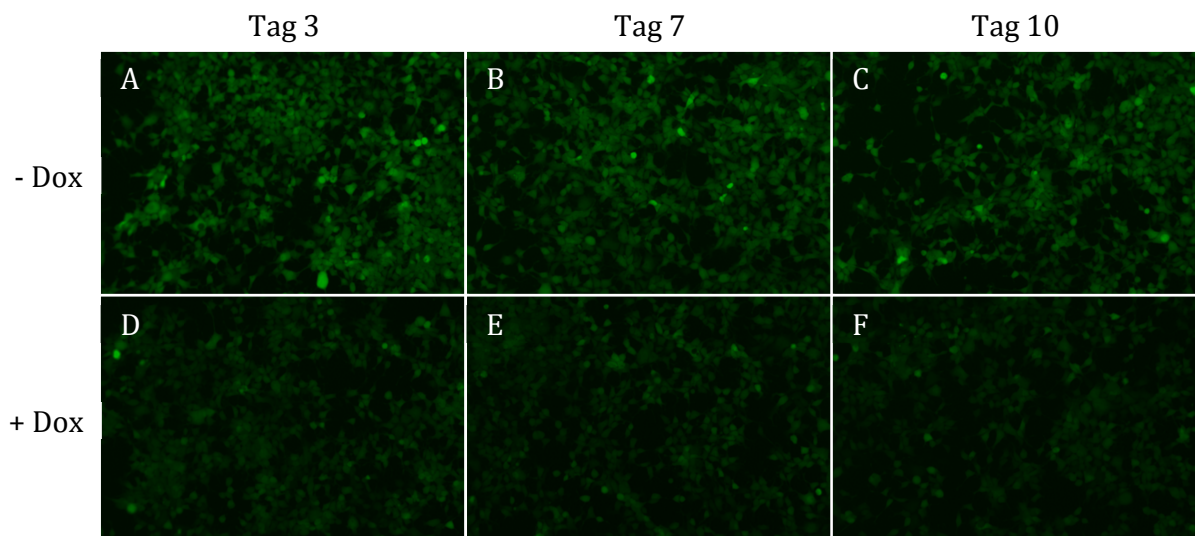


Abbildung 21: Detektion der EGFP-Fluoreszenz in Zellen der Zelllinie *HBA2-short_AS*. Die Aufnahmen im oberen Teil der Abbildung zeigen die unbehandelten Kontrollen der Zelllinie *HBA2-short_AS* **A** drei, **B** sieben und **C** zehn Tage nach Beginn des Experiments. Im unteren Teil der Abbildung sind die **D** drei, **E** sieben und **F** zehn Tage mit Doxycyclin behandelten Zellen zu sehen, die eine geringere EGFP-Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen. Die Aufnahmen der Kontrollen und der mit Doxycyclin behandelten Zellen erfolgten parallel zum jeweils gleichen Zeitpunkt. Abgebildet sind repräsentativ die Aufnahmen von einem der drei untersuchten Zellklone, die mit 100-facher Vergrößerung, einer Belichtungsdauer von 277 ms und einem Helligkeitswert von 4,2 mit dem Inversmikroskop DMI4000 B von Leica Microsystems (Wetzlar) erfolgten. Die Aufnahmen der beiden anderen Zellklone der Zelllinie *HBA2-short_AS* sind mit den dargestellten Ergebnissen vergleichbar.

Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten die mit Doxycyclin behandelten Zellen eine geringere EGFP-Fluoreszenz, was darauf schließen lässt, dass das *EGFP*-Gen in diesen Zellen schwächer exprimiert wurde. Die Stärke der EGFP-Fluoreszenz war bei den für drei, sieben und zehn Tagen mit Doxycyclin behandelten Zellen vergleichbar und eine Zunahme des Effektes durch eine längere Behandlungsdauer in dieser Analyse nicht erkennbar.

Die untersuchten stabilen Linien der anderen Testpromotoren wiesen im Vergleich zur Zelllinie *HBA2-short_AS* eine geringere EGFP-Fluoreszenz auf: Für die drei Zellklone der Zelllinie *UBE3A_AS* konnte eine mäßige EGFP-Fluoreszenz detektiert werden, die in den mit

Doxycyclin behandelten Zellen noch schwächer war. Die Detektion der EGFP-Fluoreszenz der Zelllinie *HBA2-long_AS* war kaum noch möglich und für die Zelllinie *MSH2_Sense* konnte keine EGFP-Fluoreszenz erfasst werden, da die Promotoraktivität von *MSH2* hierfür zu schwach war (Daten sind nicht gezeigt).

3.2.8 Auswirkungen der überlappenden Transkription auf die Genexpression

3.2.8.1 Untersuchung der überlappenden Transkription mittels qRT-PCR

Für eine genauere Untersuchung der Auswirkungen, die durch eine überlappende Transkription mit den Testpromotoren hervorgerufen werden, wurde die Expression von Exon_2/3 und *EGFP* mittels qRT-PCR analysiert. Hierfür wurde die reverse Transkription von Gesamt-RNA mit Oligo d(T)₁₆-Primern durchgeführt, die an den PolyA-Schwanz der mRNA-Transkripte binden. Auf diese Weise sollte gewährleistet werden, dass nur von vollständig transkribierten, und nicht bereits vorzeitig abgebrochenen, mRNA-Transkripten cDNA synthetisiert wurde. Zudem erfolgte die qRT-PCR für Exon_2/3 mit einem Primer-Paar, das in Exon 2 und Exon 3 bindet. Dadurch sollte ebenfalls eine Detektion von vorzeitig abgebrochenen Transkripten, die kein Exon 3 beinhalten, verhindert werden. Des Weiteren sollte hierdurch eine Detektion von ungespleißten Transkripten verhindert werden, da diese neben Intron 2 auch das Minigen enthalten. Das mit den Primern vervielfältigte Produkt umfasst für das gespleißte Exon_2/3-Transkript 61 Basenpaare, für die ungespleißten Exon_2/3-Transkripte, abhängig von der Länge des jeweiligen Testpromotors, zwischen 2,5 und 3,5 Kilobasen. Eine Detektion von ungespleißten Exon_2/3-Transkripten, welche das Minigen beinhalten, konnte daher bei der durchgeführten qRT-PCR ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu Exon_2/3 besitzt das integrierte *EGFP*-Gen kein Intron, weshalb keine Intron-überspannenden Primer für die qRT-PCR eingesetzt werden konnten. Durch die bereits erwähnte cDNA-Synthese mit Oligo d(T)₁₆-Primern konnte eine Detektion von vorzeitig abgebrochenen Transkripten jedoch unterbunden werden.

Die in der Zelllinie *Basic_Vector* und den *Sense*- und *Antisense*-Zelllinien nach der Induktion des *CMV*-Promotors erwartete Expression von Exon_2/3 und *EGFP* ist in Abbildung 22 gezeigt.

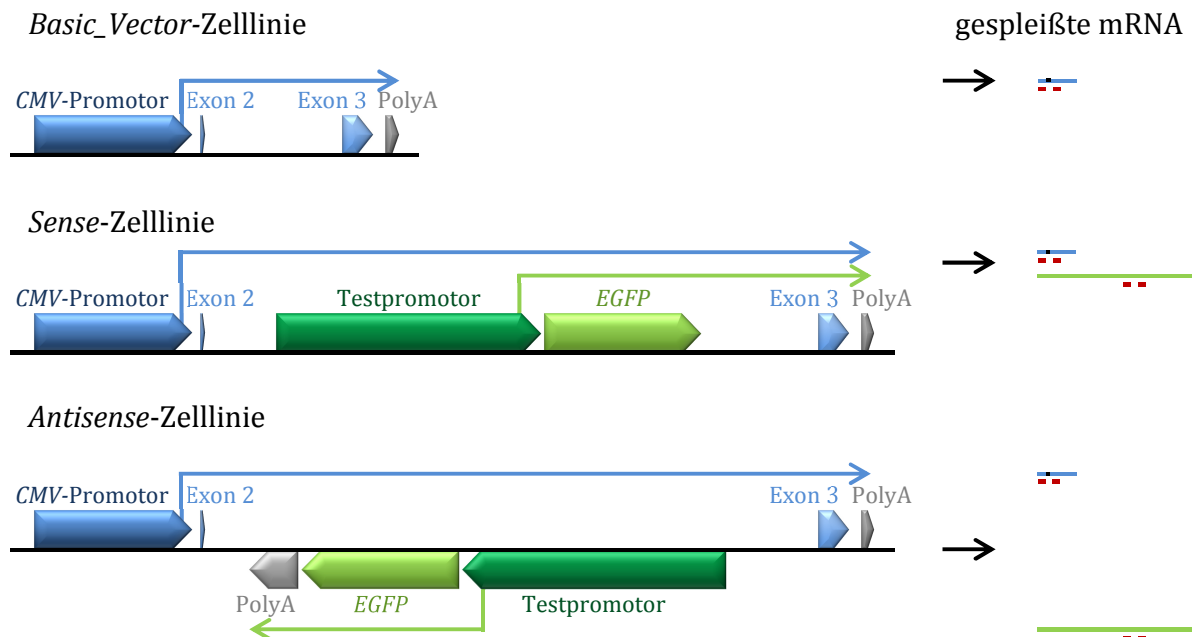


Abbildung 22: Übersicht über die in den verschiedenen Zelllinien erwartete Expression von Exon_2/3 und EGFP nach der Induktion des CMV-Promotors mit Doxycyclin. Nach Induktion des CMV-Promotors (dunkelblau) mit Doxycyclin erfolgt in allen Zelllinien die Transkription von Exon_2/3 (hellblau). Das erwartete, gespleißte mRNA-Transkript ist im rechten Teil der Abbildung mit den Primern für die qRT-PCR (rot) dargestellt, die sowohl in Exon 2 als auch in Exon 3 (hellblaue Linie) binden. Die Sense- und Antisense-Zelllinien transkribieren zusätzlich dazu das EGFP-Reportergen (hellgrün), welches durch den jeweiligen Testpromotor (dunkelgrün) kontrolliert wird. Die erwarteten mRNA-Transkripte von EGFP (hellgrüne Linie) sind unterhalb der Exon_2/3-Transkripte dargestellt. Nach Induktion des CMV-Promotors überlappt bei den Sense- und Antisense-Zelllinien die Transkription von Exon_2/3 und EGFP.

Jeweils drei Klone der Zelllinien *UBE3A_AS*, *HBA2-short_AS*, *HBA2-long_AS* und *MSH2_Sense* wurden für drei, sieben, zehn und 14 Tage mit Doxycyclin behandelt und für jeden Zeitpunkt eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

Für die qRT-PCR-Analyse wurde *GAPDH* als Referenzgen für die Normalisierung der Exon_2/3- und EGFP-Expression eingesetzt. Zudem wurde der Mittelwert der Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen auf eins gesetzt. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt.

Nach der Induktion des CMV-Promotors mit Doxycyclin wurde für die Zelllinie *UBE3A_AS* eine circa 23-fache Zunahme der Exon_2/3-Expression bestimmt (Abbildung 23). Die Dauer der Doxycyclin-Behandlung hatte dabei keinen Einfluss auf die Stärke der Expression. Nach dreitägiger Behandlung der Zellen mit Doxycyclin wurde Exon_2/3 in ähnlicher Höhe wie nach 14-tägiger Doxycyclin-Behandlung exprimiert. Im Gegensatz zur Exon_2/3-Expression, war die EGFP-Expression in den mit Doxycyclin behandelten Zellen reduziert und wurde im Vergleich zu den Kontrollen circa vierfach schwächer exprimiert. Dabei hatte die

unterschiedliche Dauer der Doxycyclin-Behandlung ebenfalls keinen Einfluss auf das Ergebnis.

Einer der untersuchten unbehandelten Klone der Zelllinie *UBE3A_AS* zeigte eine, im Vergleich zu den anderen beiden Zellklonen, stark abweichende *EGFP*-Expression (Abbildung 23).

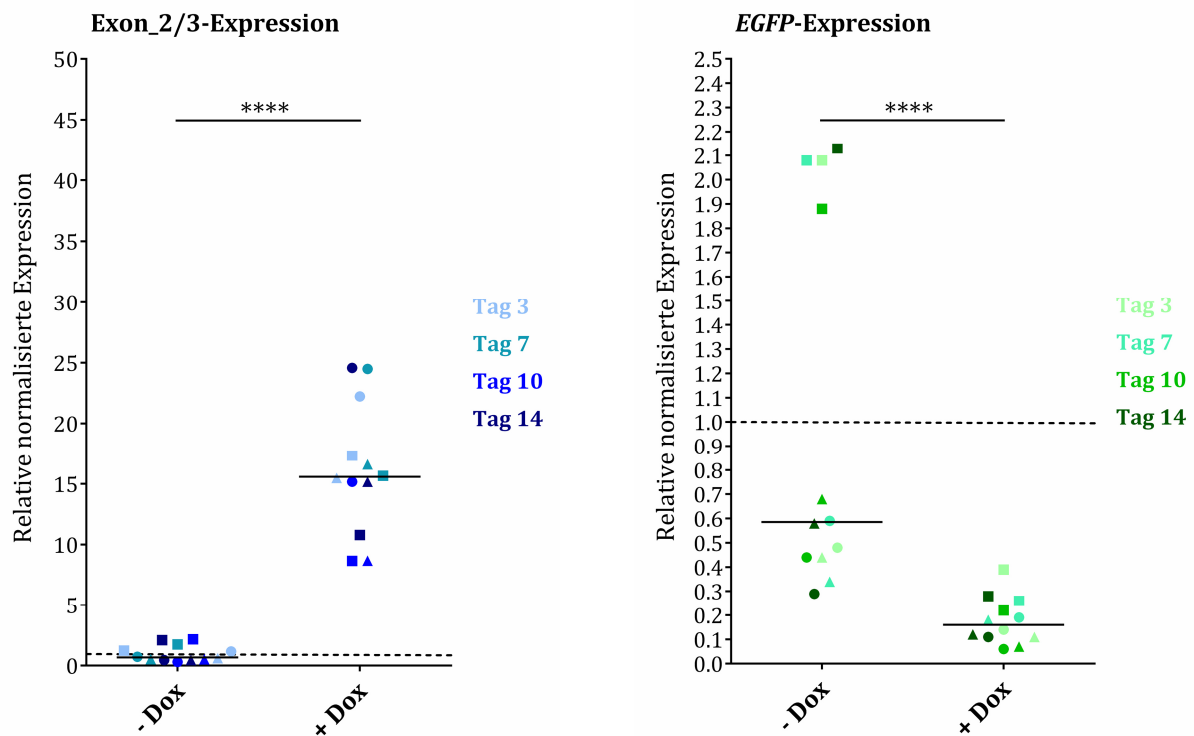


Abbildung 23: qRT-PCR-Ergebnisse der Exon_2/3- und *EGFP*-Expression in den mit Doxycyclin behandelten und unbehandelten Ansätzen der Zelllinie *UBE3A_AS*. Drei verschiedene Klone der Zelllinie *UBE3A_AS* (Kreis, Quadrat und Dreieck) wurden für drei, sieben, zehn sowie 14 Tage mit Doxycyclin behandelt (+ Dox) und für jeden Zeitpunkt eine unbehandelte Kontrolle (- Dox) mitgeführt. Nach Zugabe von Doxycyclin zeigten die Zellen, im Vergleich zu den Kontrollen, eine höhere Exon_2/3- (blau) und niedrigere *EGFP*-Expression (grün). Dabei ist die Dauer der Doxycyclin-Behandlung mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. Die Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert und der jeweilige Mittelwert der Exon_2/3- bzw. *EGFP*-Expression der Kontrollen auf eins gesetzt. Der Median ist angegeben und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit einem Mann-Whitney-Test (**** $p \leq 0,0001$).

Für die Zelllinien *HBA2-short_AS* und *HBA2-long_AS* wurde eine circa zehnfache bzw. 21-fache Zunahme der Exon_2/3-Expression nach Induktion des *CMV*-Promotors mit Doxycyclin bestimmt. Die *EGFP*-Expression war nach der Doxycyclin-Behandlung in *HBA2-short_AS*-Zellen (Abbildung 24) als auch Zellen der Linie *HBA2-long_AS* (Abbildung 25) circa dreifach niedriger als in den Kontrollen. Im Vergleich zur Zelllinie *HBA2-long_AS* variieren die Ergebnisse der Exon_2/3- und *EGFP*-Expression für *HBA2-short_AS* in Bezug auf die Dauer der Doxycyclin-Behandlung und auch zwischen den einzelnen Zellklonen

deutlich stärker. Nach dreitägiger Behandlung der Zelllinie *HBA2-short_AS* mit Doxycyclin wurde eine, im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten, höhere Exon_2/3-Expression bestimmt. Zusätzlich dazu variierte auch die *EGFP*-Expression sowohl zwischen den verschiedenen Zeitpunkten als auch den unterschiedlichen Zellklonen stark. Die circa dreifache Abnahme der *EGFP*-Expression ist für die Zelllinie *HBA2-short_AS* daher deutlich weniger signifikant als für die Zelllinie *HBA2-long_AS*.

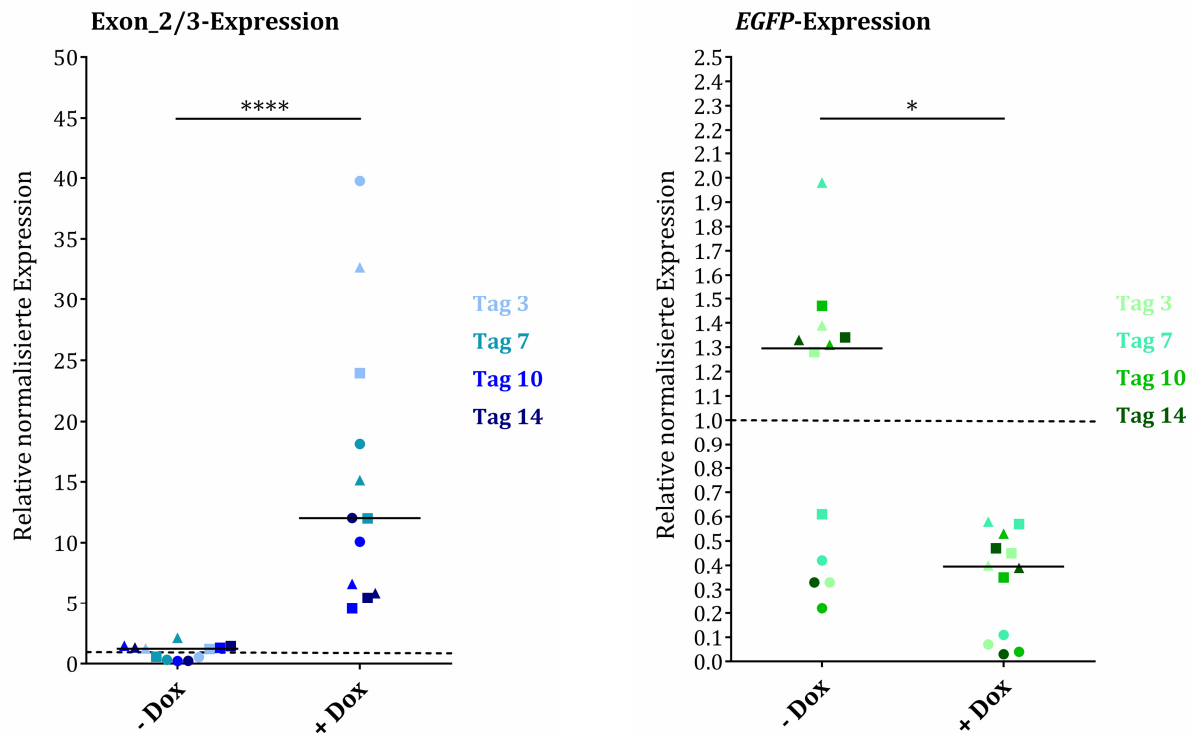


Abbildung 24: Expression von Exon_2/3 und *EGFP* in den mit Doxycyclin behandelten und unbehandelten *HBA2-short_AS*-Zellen. Für drei, sieben, zehn sowie 14 Tage wurden drei Klone der Zelllinie *HBA2-short_AS* (Kreis, Quadrat und Dreieck) mit Doxycyclin behandelt (+ Dox) und für jeden Zeitpunkt eine Kontrolle (- Dox) mitgeführt. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten die behandelten Zellen nach Zugabe von Doxycyclin eine höhere Exon_2/3-Expression (blau) und eine Abnahme der *EGFP*-Expression (grün). Die unterschiedlichen Farben stehen für die Dauer der Doxycyclin-Behandlung. Alle Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert und der jeweilige Mittelwert der Exon_2/3- bzw. *EGFP*-Expression der Kontrollen auf eins gesetzt. Der Median ist gezeigt und für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt (**** $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$).

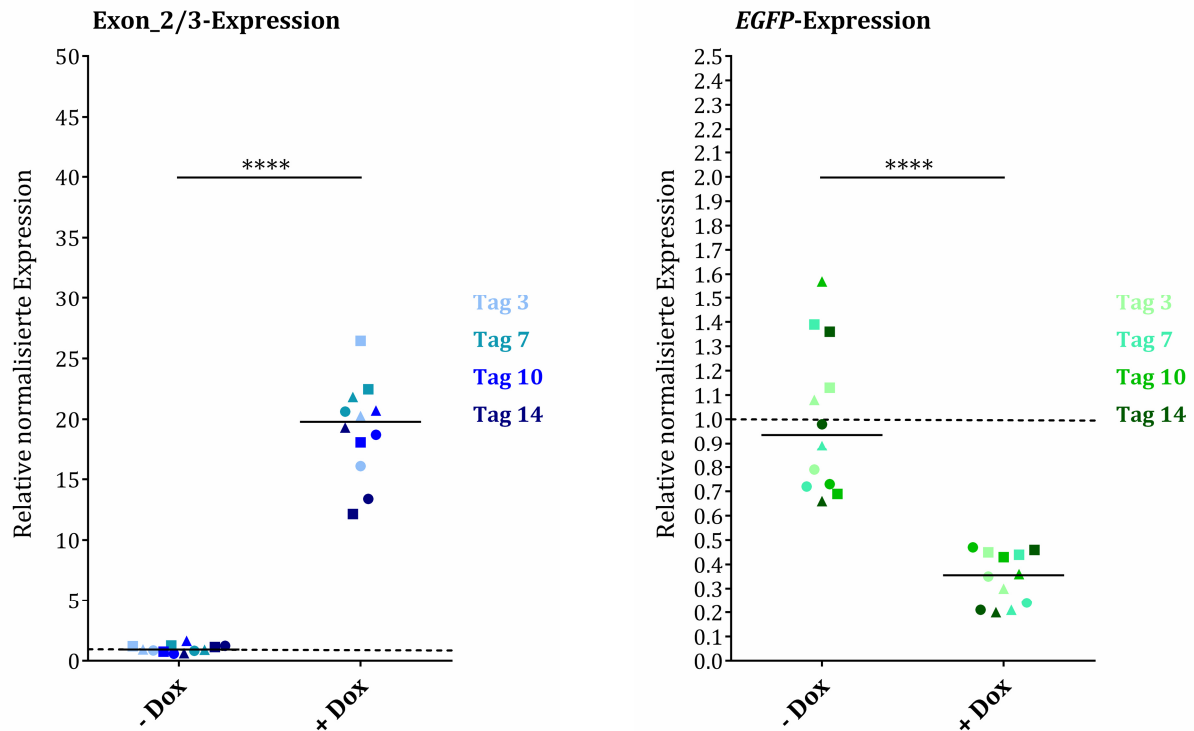


Abbildung 25: Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse für die Exon_2/3- und EGFP-Expression in den mit Doxycyclin behandelten und unbehandelten HBA2-long_AS-Zellen. Drei verschiedene HBA2-long_AS-Klone (Kreis, Quadrat und Dreieck) wurden für drei, sieben, zehn sowie 14 Tage mit Doxycyclin behandelt (+ Dox) und für jeden Zeitpunkt eine unbehandelte Kontrolle (- Dox) mitgeführt. Nach Zugabe von Doxycyclin zeigten die Zellen eine höhere Exon_2/3- (blau) und niedrigere EGFP-Expression (grün) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Die Dauer der Doxycyclin-Behandlung ist mit unterschiedlichen Farben angegeben. Für die Normalisierung der Daten wurde GAPDH als Referenzgen verwendet und der jeweilige Mittelwert der Exon_2/3- bzw. EGFP-Expression der Kontrollen auf eins gesetzt. Der Median ist eingezeichnet und die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit einem Mann-Whitney-Test berechnet (**** $p \leq 0,0001$).

Nach der Induktion des CMV-Promotors in drei verschiedenen Klonen der Zelllinie MSH2_Sense konnte, verglichen mit den Kontrollen, nur eine circa achtfach höhere Exon_2/3-Expression nachgewiesen werden. Damit zeigte MSH2_Sense, im Vergleich zu den anderen Zelllinien, die schwächste Zunahme der Exon_2/3-Expression. Zudem variierten die Ergebnisse der EGFP-Expression für die unterschiedlichen Zellklone sehr stark. Eine signifikante Änderung der EGFP-Expression konnte daher auf diese Weise nicht nachgewiesen werden (Abbildung 26).

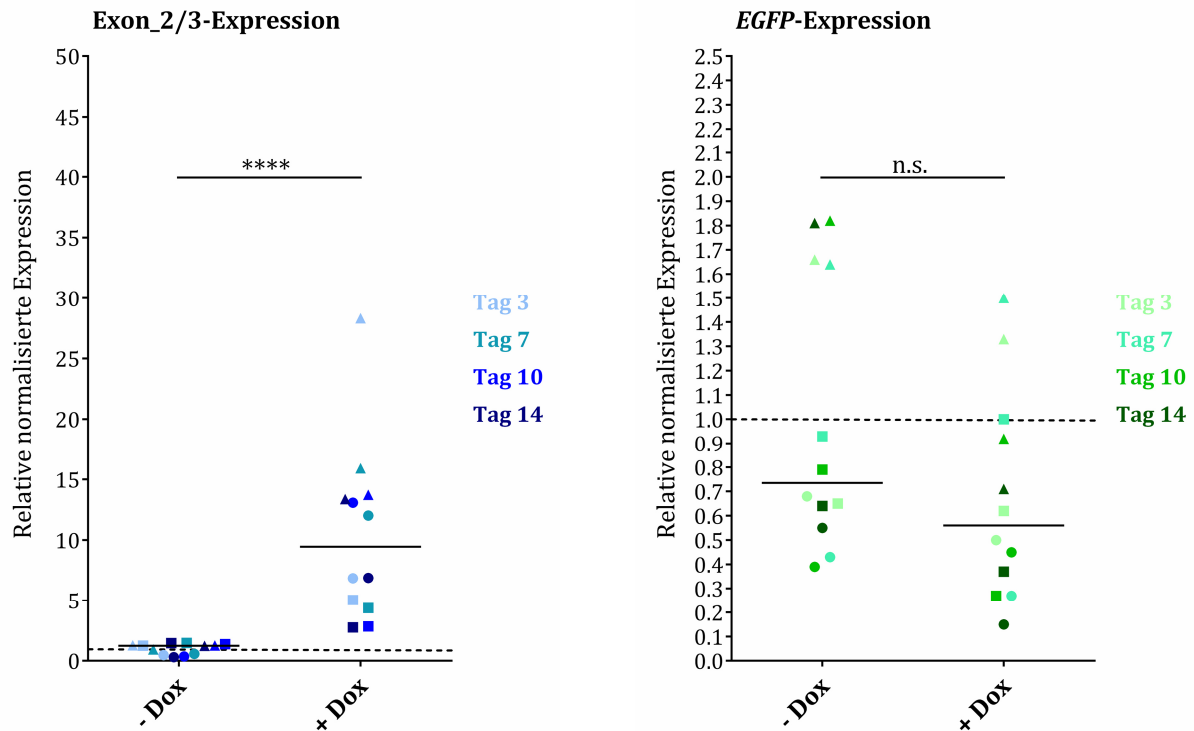


Abbildung 26: Exon_2/3- und EGFP-Expression in den mit Doxycyclin behandelten und unbehandelten Ansätzen der Zelllinie *MSH2_Sense*. Für drei, sieben, zehn sowie 14 Tage wurden drei *MSH2_Sense*-Klone (Kreis, Quadrat und Dreieck) mit Doxycyclin behandelt (+ Dox) und für jeden Zeitpunkt eine Kontrolle (- Dox) mitgeführt. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigten die mit Doxycyclin behandelten Zellen eine höhere Exon_2/3-Expression (blau), aber keine signifikant niedrigere EGFP-Expression (grün). Die unterschiedlichen Farben kennzeichnen die Dauer der Doxycyclin-Behandlung. Für die Normalisierung der Daten wurde *GAPDH* als Referenzgen verwendet und der jeweilige Mittelwert der Exon_2/3- bzw. EGFP-Expression der Kontrollen auf eins gesetzt. Der Median ist angegeben und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit einem Mann-Whitney-Test (**** $p \leq 0,0001$).

Mit Ausnahme von *MSH2_Sense* zeigten die untersuchten Zelllinien somit nach drei, sieben, zehn und 14 Tagen Doxycyclin-Behandlung sowohl eine Änderung der Exon_2/3- als auch der EGFP-Expression. Durch die Zugabe von Doxycyclin wurde die überlappende Transkription zwischen Exon_2/3- und EGFP-Transkripten induziert. Da eine Auswirkung von Doxycyclin auf die Promotoraktivität zuvor ausgeschlossen wurde, erfolgte die Abnahme der EGFP-Expression in den mit Doxycyclin behandelten Zellen somit durch die Induktion der überlappenden Transkription. Die Ergebnisse zeigen jedoch teilweise eine starke Streuung, weshalb das Verfahren zur Untersuchung der überlappenden Transkription optimiert wurde.

3.2.8.2 Optimierte Untersuchung der überlappenden Transkription mittels qRT-PCR

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen im vorangegangenen Kapitel zeigen zwar eine Korrelation zwischen der Induktion der überlappenden Transkription und einer Abnahme

der *EGFP*-Expression, allerdings variieren die Ergebnisse für die untersuchten Klone einer Zelllinie teilweise sehr stark. Für die Zelllinie *MSH2_Sense* konnte daher keine signifikante Abnahme der *EGFP*-Expression ermittelt werden.

Mögliche Faktoren, die die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflusst haben könnten, sind das verwendete FBS und die RNA-Extraktionsmethode. Für die vorangegangenen Experimente wurden die Zellen in Medium mit FBS kultiviert, das vom Hersteller nicht explizit auf die Abwesenheit von Tetracyclin überprüft wurde. Der *CMV*-Promotor ist jedoch neben Doxycyclin auch mit Tetracyclin induzierbar, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass bereits im eigentlich nicht induzierten Zustand eine erhöhte Aktivität des *CMV*-Promotors und eine damit verbundene überlappende Transkription vorlag. Daher wurden die Zellen nun in Medium mit FBS kultiviert, welches vom Hersteller untersucht und als Tetracyclin-frei erklärt wurde.

Auch die Integrität der RNA und Rückstände des für die Extraktion mit *TRIzol*® verwendeten Phenols, können qRT-PCR-Analysen beeinflussen. Daher erfolgte die RNA-Extraktion nun mit dem *AllPrep*® *DNA/RNA/Protein Mini Kit*. Auf diese Weise konnten die Zellansätze verkleinert werden, da hierdurch neben RNA auch DNA aus dem gleichen Zellansatz extrahiert und für die nachfolgenden Methylierungsanalysen eingesetzt werden konnte.

Die jeweiligen Klone der Zelllinien *UBE3A_AS*, *HBA2-short_AS*, *HBA2-long_AS* und *MSH2_Sense* der vorangegangenen Experimente, wurden erneut für drei, sieben, zehn und 14 Tage mit Doxycyclin behandelt. Zusätzlich dazu wurde wiederum für jeden Zellklon eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt, die zeitgleich mit den behandelten Zellen geerntet wurde. Die Normalisierung und Auswertung der Ergebnisse erfolgte auf die gleiche Weise wie in Kapitel 3.2.8.1 beschrieben.

Für die Zelllinie *UBE3A_AS* konnte hierdurch eine circa siebenfache Steigerung der Exon_{2/3}-Expression nach Induktion des *CMV*-Promotors nachgewiesen werden, die *EGFP*-Expression war in den mit Doxycyclin behandelten Zellen circa sechsfach niedriger als in den Kontrollen. Die Ergebnisse für die unterschiedlichen Zellklone und die Dauer der Doxycyclin-Behandlung unterscheiden sich dabei nicht wesentlich. Durch eine längere Doxycyclin-Behandlung wurde keine stärkere Zunahme der Exon_{2/3}- und Abnahme der *EGFP*-Expression beobachtet (Abbildung 27). Die vorherigen Ergebnisse hatten eine circa 23-fache Zunahme der Exon_{2/3}-Expression und eine circa vierfache Abnahme der *EGFP*-Expression gezeigt.

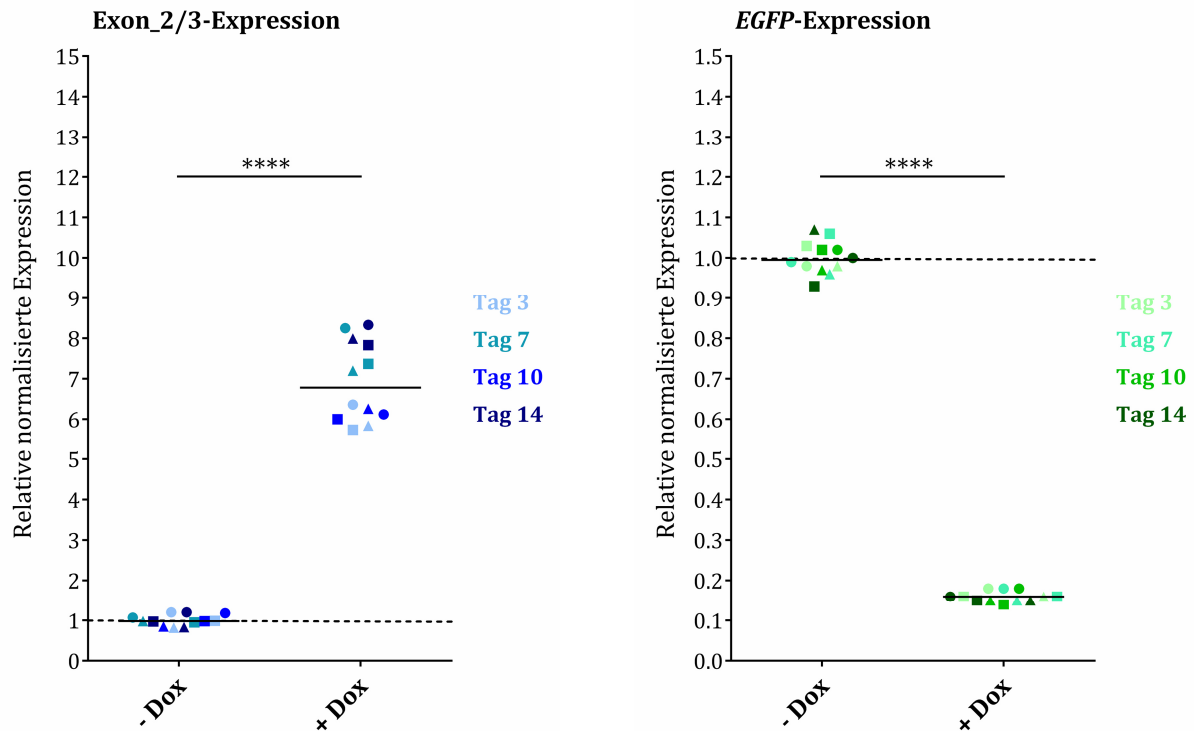


Abbildung 27: Expression von Exon_2/3 und EGFP in den mit Doxycyclin behandelten und unbehandelten UBE3A_AS-Zellen mit optimiertem Protokoll. Für drei, sieben, zehn sowie 14 Tage wurden drei Klone der Zelllinie UBE3A_AS (Kreis, Quadrat und Dreieck) mit Doxycyclin behandelt (+ Dox) und für jeden Zeitpunkt eine Kontrolle (- Dox) mitgeführt. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten die behandelten Zellen nach Zugabe von Doxycyclin eine höhere Exon_2/3- (blau) und niedrigere EGFP-Expression (grün). Die unterschiedlichen Farben stehen für die Dauer der Doxycyclin-Behandlung. Alle Ergebnisse wurden auf die Expression von GAPDH normalisiert und der jeweilige Mittelwert der Exon_2/3- bzw. EGFP-Expression der Kontrollen auf eins gesetzt. Der Median ist angegeben und für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt (**** $p \leq 0,0001$).

Auch für die Zelllinien *HBA2-short_AS* und *HBA2-long_AS* konnte auf diese Weise, im Vergleich zu den Kontrollen, eine Zunahme der Exon_2/3- und Abnahme der EGFP-Expression nachgewiesen werden. Für *HBA2-short_AS* wurde nach Induktion des CMV-Promotors mit Doxycyclin eine circa siebenfach höhere Exon_2/3-Expression bestimmt (Abbildung 28), für *HBA2-long_AS* eine circa achtfache Zunahme (Abbildung 29). Die EGFP-Expression nahm im Vergleich zu den Kontrollen in beiden Zelllinien circa dreifach ab. Im vorangegangenen Experiment wurde für *HBA2-short_AS* eine zehnfache und für *HBA2-long_AS* eine 21-fache Zunahme der Exon_2/3-Expression bestimmt. Die EGFP-Expression nahm dabei ebenfalls für beide Zelllinien circa dreifach ab.

Für *HBA2-short_AS* wurde im vorangegangenen Experiment nach einer dreitägigen Behandlung mit Doxycyclin eine im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten deutlich höhere, aber in den drei Replikaten sehr variable, Exon_2/3-Expression ermittelt (Abbildung 24).

Das optimierte Verfahren zeigt diese Ausreißer nicht mehr, die Daten sind wesentlich konsistenter.

Die *EGFP*-Expression der drei verschiedenen unbehandelten *HBA2-long_AS*-Zellklone variierte zwar, die Abnahme der *EGFP*-Expression in den mit Doxycyclin behandelten Zellen ist jedoch trotzdem signifikant.

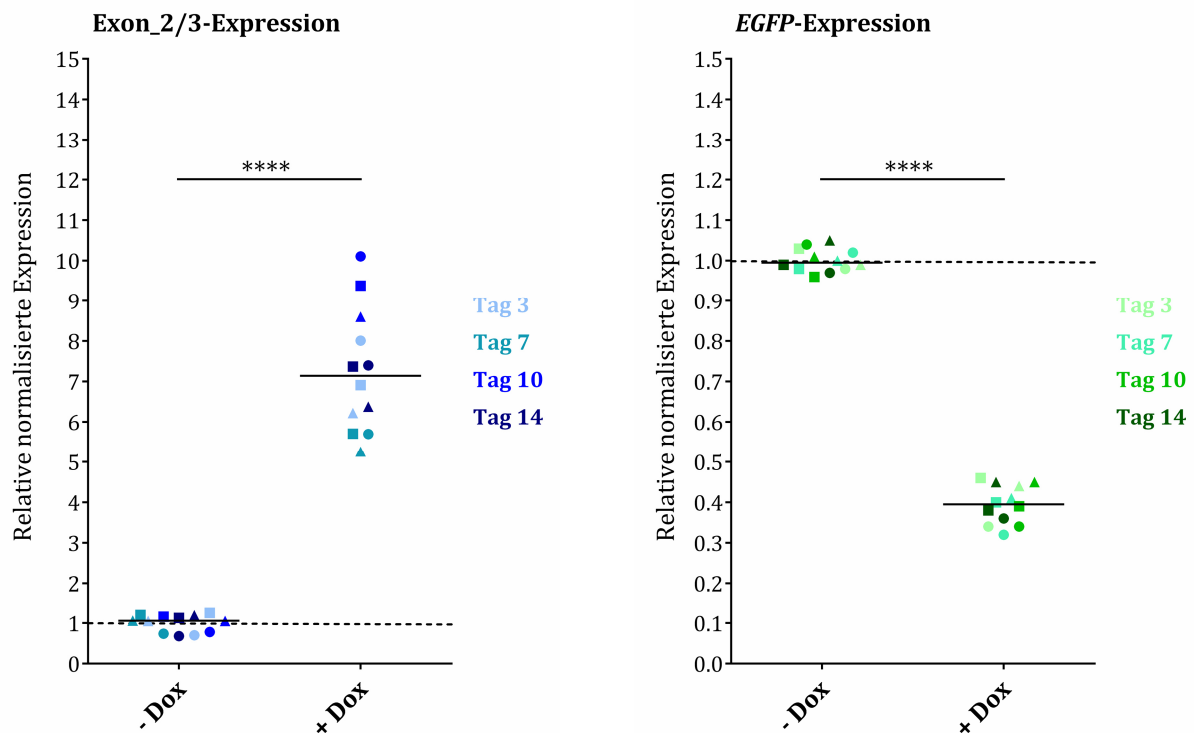


Abbildung 28: qRT-PCR-Ergebnisse der Exon_2/3- und *EGFP*-Expression in den mit Doxycyclin behandelten und unbehandelten Ansätzen der Zelllinie *HBA2-short_AS* mit optimiertem Verfahren. Drei verschiedene Klone der Zelllinie *HBA2-short_AS* (Kreis, Quadrat und Dreieck) wurden für drei, sieben, zehn sowie 14 Tage mit Doxycyclin behandelt (+ Dox) und für jeden Zeitpunkt eine unbehandelte Kontrolle (- Dox) mitgeführt. Nach Zugabe von Doxycyclin zeigten die Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, eine höhere Exon_2/3- (blau) und niedrigere *EGFP*-Expression (grün). Die Dauer der Doxycyclin-Behandlung ist mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. Alle Ergebnisse wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert und der jeweilige Mittelwert der Exon_2/3- bzw. *EGFP*-Expression der Kontrollen auf eins gesetzt. Der Median ist eingezeichnet und die statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-Test berechnet (**** $p \leq 0,0001$).

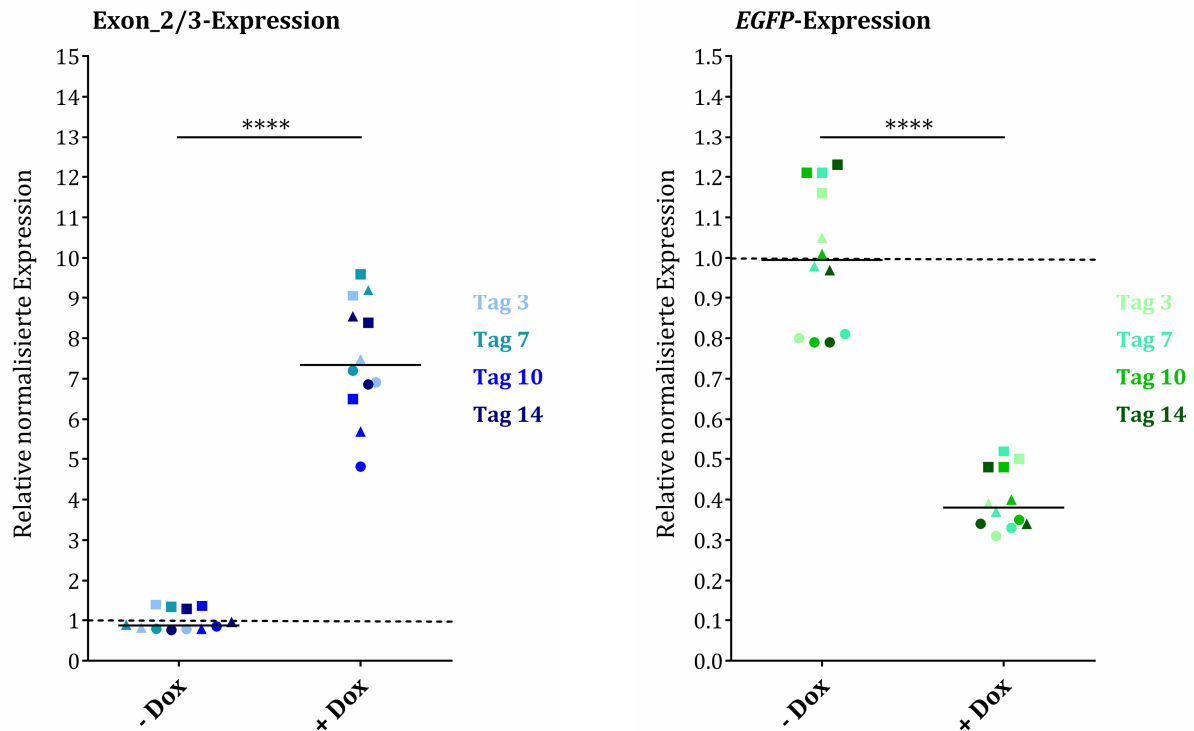


Abbildung 29: Exon_2/3- und EGFP-Expression in den mit Doxycyclin behandelten und unbehandelten Ansätzen der Zelllinie *HBA2-long_AS* mit optimiertem Protokoll. Für drei, sieben, zehn sowie 14 Tage wurden drei *HBA2-long_AS*-Klone (Kreis, Quadrat und Dreieck) mit Doxycyclin behandelt (+ Dox) und für jeden Zeitpunkt eine Kontrolle (- Dox) mitgeführt. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigten die mit Doxycyclin behandelten Zellen eine höhere Exon_2/3- (blau) und eine niedrigere EGFP-Expression (grün). Die unterschiedlichen Farben kennzeichnen die Dauer der Doxycyclin-Behandlung. Für die Normalisierung der Daten wurde *GAPDH* als Referenzgen verwendet und der jeweilige Mittelwert der Exon_2/3- bzw. EGFP-Expression der Kontrollen auf eins gesetzt. Der Median ist angegeben und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit einem Mann-Whitney-Test (**** $p \leq 0,0001$).

Die Zelllinie *MSH2_Sense* zeigte, im Vergleich zu den Zelllinien *UBE3A_AS*, *HBA2-short_AS* und *HBA2-long_AS*, erneut die schwächste Induktion der Exon_2/3-Expression nach Zugabe von Doxycyclin. Diese war in den mit Doxycyclin behandelten Zellen circa fünffach höher als in den unbehandelten Kontrollen. Für die EGFP-Expression konnte im vorangegangenen Experiment keine signifikante Änderung durch eine Behandlung der Zellen mit Doxycyclin nachgewiesen werden. Durch die Optimierung des Verfahrens konnte nun eine signifikante, circa zweifache Abnahme der EGFP-Expression beobachtet werden (Abbildung 30). Sowohl die Ergebnisse für die Exon_2/3-Expression als auch die der EGFP-Expression zeigen jedoch, dass sich die einzelnen Zellklone der Zelllinie *MSH2_Sense* sehr unterschiedlich verhielten. Einer der Zellklone (dargestellt als Quadrat) zeigte eine circa zweifache Steigerung der Exon_2/3-Expression, ein anderer (dargestellt als Kreis) dagegen eine circa fünffache Zunahme und ein dritter Zellklon (dargestellt als Dreieck) eine circa elffache gesteigerte Exon_2/3-Expression. Die Ergebnisse für die EGFP-Expression variieren auch für die

Kontrollen stark und sind daher weniger signifikant als die der anderen untersuchten Zelllinien.

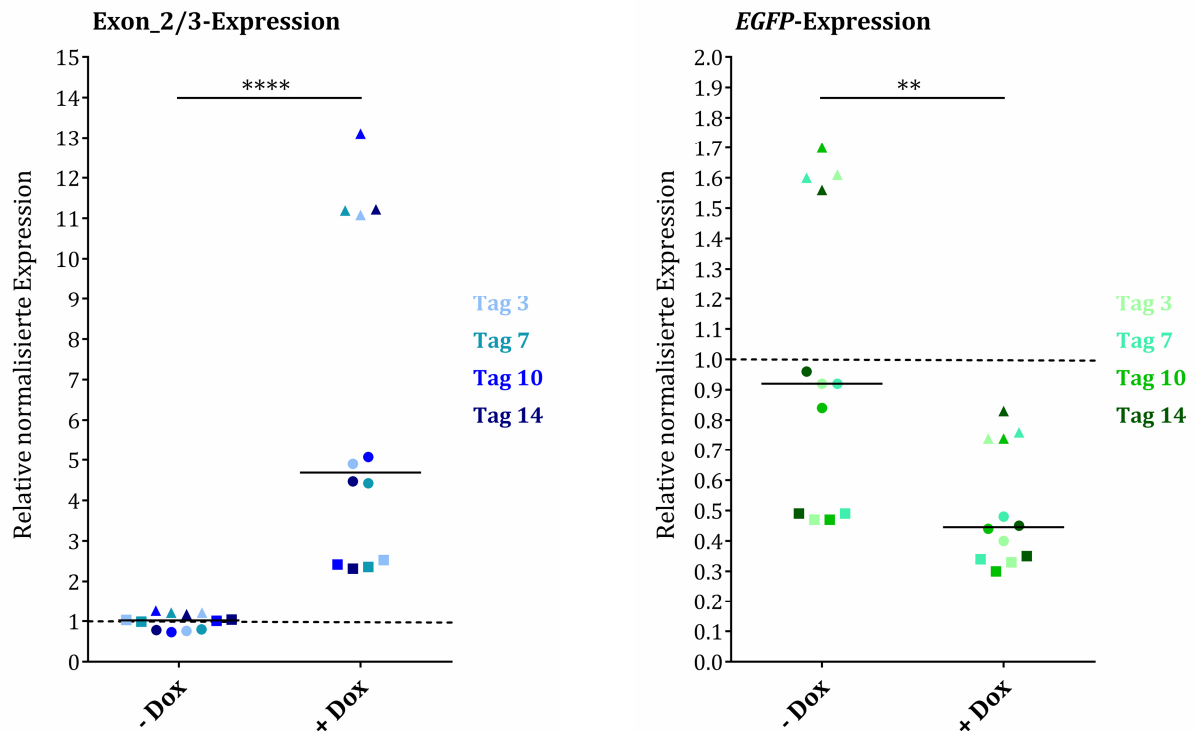


Abbildung 30: Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse für die Exon_2/3- und EGFP-Expression in den mit Doxycyclin behandelten und unbehandelten *MSH2-Sense*-Zellen nach optimiertem Protokoll. Drei verschiedene *MSH2-Sense*-Klone (Kreis, Quadrat und Dreieck) wurden für drei, sieben, zehn sowie 14 Tage mit Doxycyclin behandelt (+ Dox) und für jeden Zeitpunkt je eine unbehandelte Kontrolle (- Dox) mitgeführt. Nach Zugabe von Doxycyclin zeigten die Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, eine höhere Exon_2/3- (blau) und niedrigere EGFP-Expression (grün). Die Dauer der Doxycyclin-Behandlung ist mit unterschiedlichen Farben angegeben. Für die Normalisierung der Daten wurde *GAPDH* als Referenzgen verwendet und der jeweilige Mittelwert der Exon_2/3- bzw. EGFP-Expression der Kontrollen auf eins gesetzt. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt (**** $p \leq 0,0001$; ** $p \leq 0,01$).

Zusätzlich dazu wurden auch drei Klone der Zelllinie *Basic_Vector* für drei Tage mit Doxycyclin behandelt und eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Die Zelllinie besitzt zwar das Exon_2/3, aber in Intron 2 ist kein Minigen (bestehend aus einem Testpromotor und dem EGFP-Reportergen) integriert. Mit dieser Zelllinie konnte daher die Exon_2/3-Expression ohne eine überlappende Transkription bestimmt werden. Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Induktion der Exon_2/3-Expression zu einer Abnahme der EGFP-Expression führt. Es ist jedoch auch möglich, dass die EGFP-Expression einen Einfluss auf die Exon_2/3-Expression hat und die Induktion in den Zelllinien mit den Minigenen niedriger ausfiel, als sie eigentlich gewesen wäre. Die Exon_2/3-Expression war in den mit Doxycyclin behandelten *Basic_Vector*-Zellen jedoch circa fünffach höher als in den

unbehandelten Kontrollen und ist somit vergleichbar zur Exon_2/3-Expression in den *Sense*- und *Antisense*-Zelllinien (Abbildung 31).

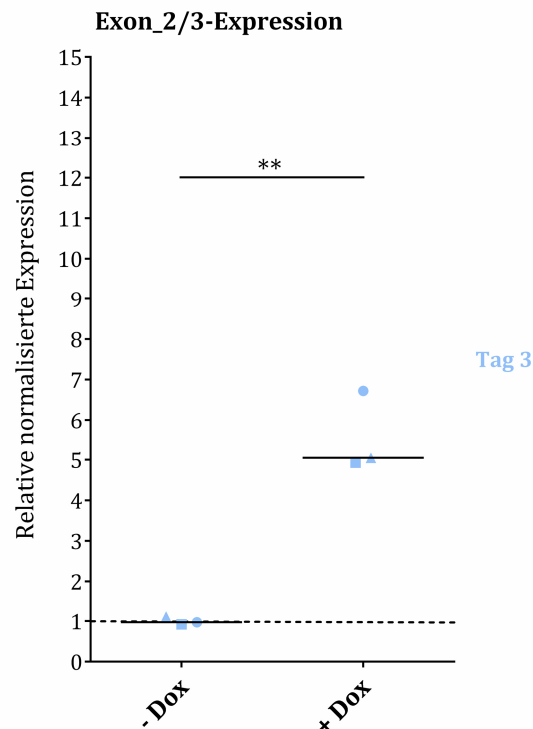


Abbildung 31: qRT-PCR-Ergebnisse der Exon_2/3-Expression in den mit Doxycyclin behandelten und unbehandelten Ansätzen der Zelllinie *Basic_Vector*. Für drei Tage wurden drei Klone der Zelllinie *Basic_Vector* (Kreis, Quadrat und Dreieck) mit Doxycyclin behandelt (+ Dox) und für jeden Zeitpunkt eine Kontrolle (- Dox) mitgeführt. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten die behandelten Zellen nach Zugabe von Doxycyclin eine höhere Exon_2/3-Expression. Für die Normalisierung der Daten wurde *GAPDH* als Referenzgen verwendet und der Mittelwert der Exon_2/3-Expression der Kontrollen auf eins gesetzt. Der Median ist angegeben und die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels T-Test, da für einen Mann-Whitney-Test nicht genügend Daten vorlagen (** $p \leq 0,01$).

Somit konnten, durch eine Veränderung der RNA-Extraktionsmethode und den Gebrauch von Tetracyclin-freiem Medium, reproduzierbare und konsistentere Ergebnisse mit einer niedrigeren Streuung erzielt werden. Alle Zelllinien zeigten nun eine signifikante Abnahme der *EGFP*-Expression, die durch die überlappende Transkription von Exon_2/3 hervorgerufen wurde.

3.2.9 Einfluss der überlappenden Transkription auf den Methylierungsstatus der Testpromotoren

3.2.9.1 Methylierungsanalyse nach 24-stündiger überlappender Transkription

Nachdem auf Transkriptebene ein Effekt der überlappenden Transkription nachgewiesen werden konnte, wurden mögliche Auswirkungen auf den Methylierungsstatus der

Testpromotoren untersucht. Patientenstudien zeigten, dass eine mit den Genen *HBA2* und *MSH2* überlappende Transkription zur Methylierung der jeweiligen Promotoren führt (Tufarelli et al. 2003; Ligtenberg et al. 2009). Der *Ube3a*-Promotor liegt hingegen auch in neuronalen Zellen, wo die überlappende Transkription der *Ube3a*- und *Snhg14*-Transkripte erfolgt, unmethyliert vor (Meng et al. 2013).

Für die Methylierungsanalyse wurde die überlappende Transkription bei jeweils einem Zellklon der Zelllinien *UBE3A_AS*, *HBA2-short_AS*, *HBA2-long_AS* und *MSH2_Sense* für 24 Stunden induziert. Dazu wurden die Zellen in Medium mit FBS kultiviert, welches nicht als Tetracyclin-frei deklariert wurde. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte mit dem *FlexiGene DNA Kit* und die Methylierungsanalyse mittels Hochdurchsatz-Bisulfit-Sequenzierung. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen des jeweiligen Zellklons.

Es wurden verschiedene *Primer* zur Vervielfältigung der entsprechenden CpG-reichen Regionen ausprobiert. Die besten Ergebnisse wurden für *UBE3A*, *HBA2-short* und *HBA2-long* mit *Primern* erzielt, die in der *EGFP*-Sequenz und der jeweiligen CpG-Insel des Testpromotors binden. Somit wurde bei der PCR-Reaktion nur die Sequenz des Testpromotors, und nicht des endogenen Promotors, vervielfältigt und anschließend analysiert. Für die Analyse des *MSH2*-Testpromotors wurden *Primer* verwendet, die beide in der Promotorregion von *MSH2* liegen und daher sowohl im Testpromotor als auch im endogenen Promotor binden. Da sich der *MSH2*-Testpromotor jedoch durch einen Basenaustausch vom endogenen Promotor unterscheidet, konnte das Ergebnis der Hochdurchsatz-Bisulfit-Sequenzierung eindeutig dem *MSH2*-Testpromotor zugeordnet werden.

Bei den im Folgenden dargestellten Ergebnissen der Methylierungsanalyse entspricht jede Spalte einem bestimmten CpG-Dinukleotid und jede Reihe einer analysierten Einzelsequenz. Dabei sind unmethylierte CpG-Dinukleotide in blau und methylierte CpG-Dinukleotide in rot angegeben. Die grauen Rechtecke zeigen fehlende Sequenzinformationen an.

Die Methylierungsanalyse des *UBE3A*-Testpromotors zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Änderung der Methylierung nach 24-stündiger Induktion der überlappenden Transkription. Es wurden insgesamt 68 CpG-Dinukleotide untersucht und sowohl in den mit Doxycyclin behandelten Zellen, als auch in der unbehandelten Kontrolle von *UBE3A_AS*, lag der *UBE3A*-Testpromotor fast vollständig unmethyliert vor. Für einzelne CpG-Dinukleotide konnte allerdings eine schwache Methylierung nachgewiesen werden, die sich teilweise zwischen den mit Doxycyclin behandelten und den unbehandelten Zellen unterschied (Abbildung 32).

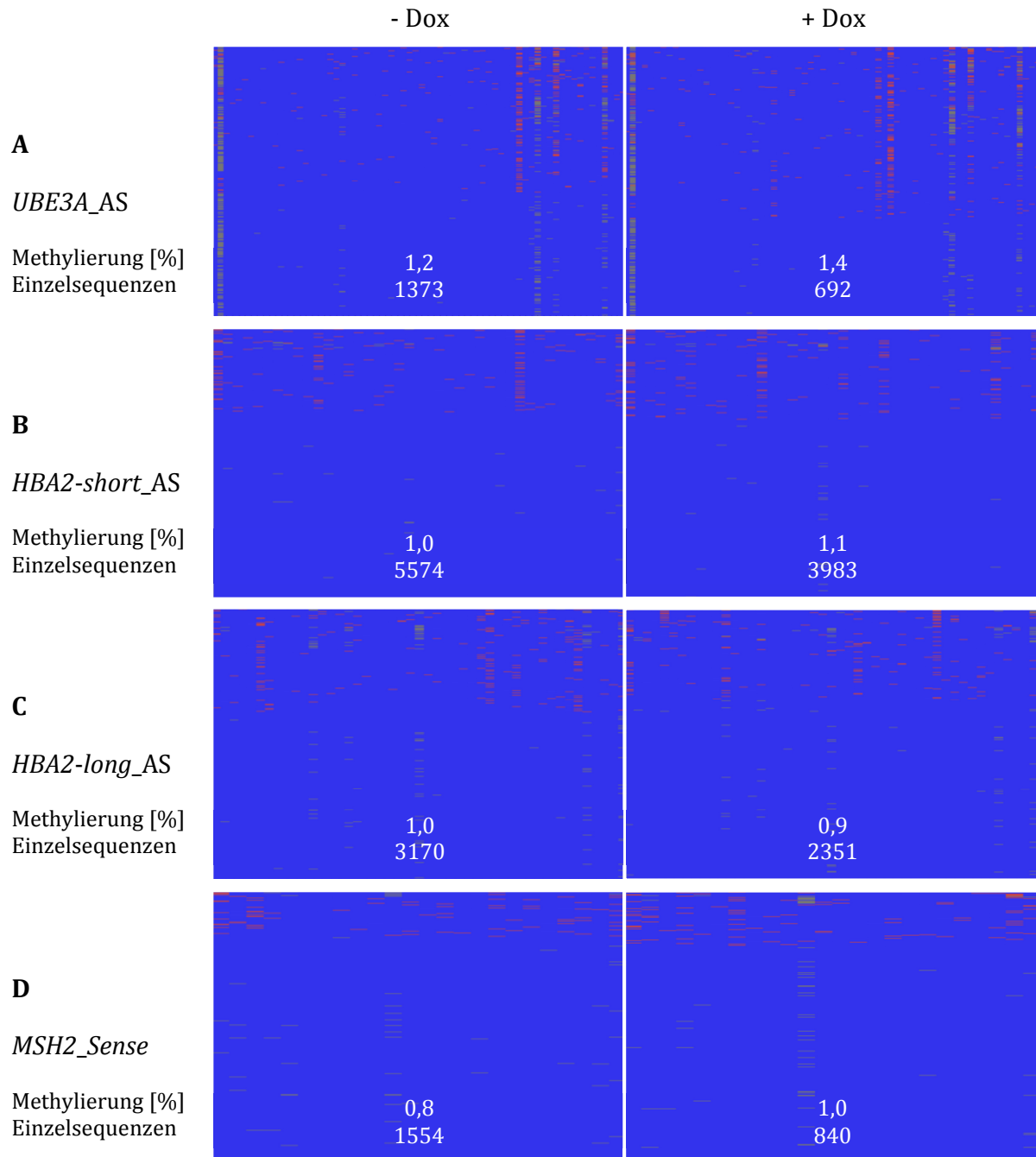


Abbildung 32: Ergebnisse der Methylierungsanalyse. Sowohl in den unbehandelten Zellen (- Dox, linke Seite) als auch in den für 24 Stunden mit Doxycyclin behandelten Zellen (+ Dox, rechte Seite) lagen die Testpromotoren der verschiedenen Zelllinien fast ausschließlich unmethyliert vor. **A** Die Methylierungsanalyse für die Zelllinie *UBE3A_AS* erfolgte mit insgesamt 68 CpG-Dinukleotiden des *UBE3A*-Testpromotors. **B** Für den *HBA2*-Promotor der Zelllinie *HBA2-short_AS* wurden 41 CpG-Dinukleotide analysiert und **C** für den *HBA2*-Promotor der Zelllinie *HBA2-long_AS* 47. **D** Die Analyse des *MSH2*-Testpromotors erfolgte für die Zelllinie *MSH2_Sense* mit 24 CpG-Dinukleotiden. Jede Spalte entspricht einem bestimmten CpG-Dinukleotid und jede Reihe einer analysierten Einzelsequenz. Unmethylierte CpG-Dinukleotide sind in blau und methylierte CpG-Dinukleotide in rot dargestellt. Graue Rechtecke stehen für fehlende Sequenzinformationen. Die durchschnittliche Methylierung wurde anhand der Einzelsequenzen bestimmt.

Auch der *HBA2*-Testpromotor lag sowohl in den Kontrollzellen als auch in den mit Doxycyclin behandelten Zellen weitgehend unmethyliert vor. Für die *HBA2*-Promotorregion der Zelllinie *HBA2-short_AS* wurden 41 CpG-Dinukleotide analysiert, für die von *HBA2-long_AS* insgesamt 47 (Abbildung 32). Die Ergebnisse der durchschnittlichen Methylierung für die Zelllinien *HBA2-short_AS* und *HBA2-long_AS* unterscheiden sich nicht wesentlich. Es konnten jedoch erneut einzelne schwach methylierte CpG-Dinukleotide nachgewiesen werden, die sich zwischen den Kontrollen und den mit Doxycyclin behandelten Zellen unterschieden.

Der *MSH2*-Testpromotor der Zelllinie *MSH2_Sense* zeigte im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls keine Änderung der Methylierung nach Induktion der überlappenden Transkription durch Doxycyclin. Die 24 analysierten CpG-Dinukleotide lagen sowohl in den mit Doxycyclin behandelten, als auch in den unbehandelten Zellen fast vollständig unmethyliert vor (Abbildung 32).

Zusätzlich dazu wurde auch der Methylierungsstatus des endogenen *MSH2*-Promotors bestimmt. Dieser war, genau wie der des *MSH2*-Testpromotors, sowohl in den mit Doxycyclin behandelten Zellen als auch in den Kontrollen, nicht methyliert (Daten sind nicht gezeigt).

3.2.9.2 Methylierungsanalyse nach 14-tägiger überlappender Transkription

Da die Methylierungsanalyse nach 24-stündiger Induktion der überlappenden Transkription keine Methylierungsänderung der Testpromotoren ergab, wurde angenommen, dass die Dauer der überlappenden Transkription für eine Methylierung der Testpromotoren aufgrund einer niedrigen Expression der *de novo* Methyltransferase *DNMT3A* in den Zelllinien nicht ausreichend war. Somit wurde die Zeitspanne der überlappenden Transkription auf 14 Tage ausgeweitet. Hierfür wurde von jeweils einem Klon der Zelllinie *UBE3A_AS*, *HBA2-short_AS* und *MSH2_Sense* genomische DNA mit dem *AllPrep*[®] *DNA/RNA/Protein Mini Kit* aus den Zellen extrahiert. Die dafür verwendeten Zellansätze sind mit denen, die für die qRT-PCR-Analysen in Kapitel 3.2.8.2 verwendet wurden, identisch. Der Methylierungsstatus wurde durch Bisulfit-Konvertierung mit nachfolgender kostengünstiger Sanger-Sequenzierung analysiert.

Bei der Methylierungsanalyse wurden die gleichen Regionen des jeweiligen Testpromotors untersucht wie bei der Analyse im vorangegangenen Kapitel (siehe Kapitel 3.2.9.1). Für den *UBE3A*-Testpromotor zeigen die Elektropherogramme der unbehandelten, aber auch der behandelten Zellen, im Bereich der CpG-Dinukleotide ein Thymin- anstelle eines

Cytosin-Nukleotids. Somit lagen die CpG-Dinukleotide nicht nur in den Kontrollen, sondern auch in den mit Doxycyclin behandelten Zellen unmethyliert vor (Abbildung 33).

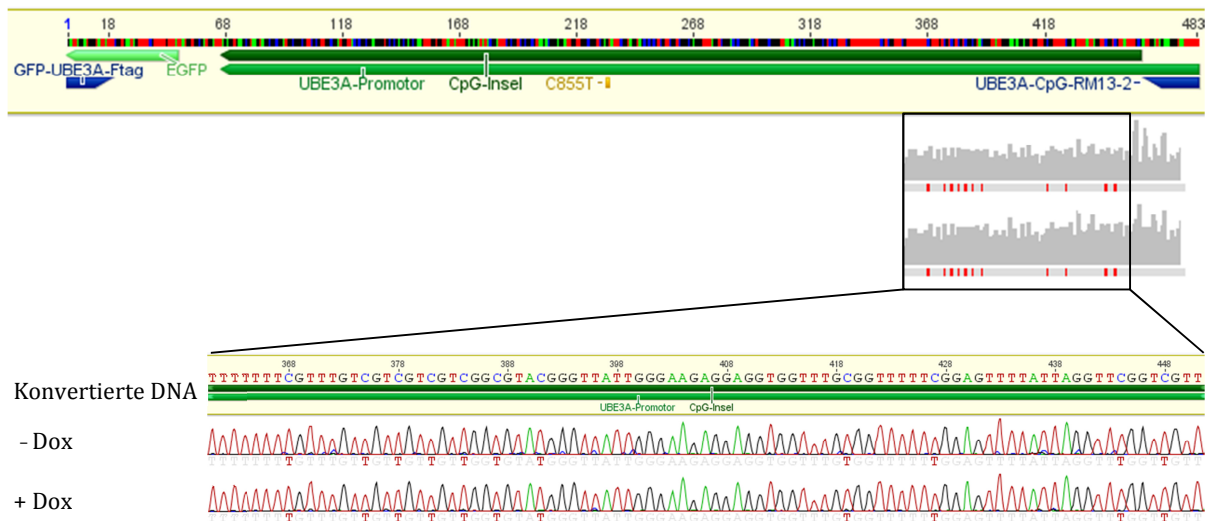


Abbildung 33: Ergebnis der Methylierungsanalyse des *UBE3A*-Testpromotors nach 14-tägiger Doxycyclin-Behandlung der Zelllinie *UBE3A_AS*. Im oberen Teil der Abbildung ist eine Übersicht über den für die Methylierungsanalyse ausgewählten Bereich dargestellt. Die für die Analyse verwendeten *Primer* (blau) binden im *EGFP*-Reportergen (hellgrün) sowie in der Promotorregion von *UBE3A* (grün) und ermöglichen die Analyse der CpG-Insel (dunkelgrün) mit dem Basenaustausch C855T (gelb). Im unteren Abschnitt sind die Elektropherogramme der Sanger-Sequenzierung (grau) von Bisulfit-behandelter genomischer DNA der Kontrollen und für 14 Tage mit Doxycyclin behandelten Zellen angegeben. Ein vergrößerter Ausschnitt zeigt die bei einer Methylierung der CpG-Dinukleotide erwartete, konvertierte DNA-Sequenz und die Ergebnisse der unbehandelten (- Dox) und behandelten Zellen (+ Dox). Die Elektropherogramme zeigen im Bereich der CpG-Dinukleotide ein Thymin anstelle eines Cytosins, was darauf schließen lässt, dass die CpG-Dinukleotide sowohl in den unbehandelten als auch in den behandelten Zellen nicht methyliert vorlagen.

Auch die Ergebnisse für den *HBA2*-Promotor in der Zelllinie *HBA2-short_AS* zeigen, dass durch die 14-tägige Induktion der überlappenden Transkription keine Methylierung des *HBA2*-Testpromotors hervorgerufen wurde. Im Bereich der CpG-Dinukleotide zeigen die Elektropherogramme, sowohl für die behandelten als auch für die unbehandelten Zellen, ein Thymin anstelle eines Cytosins (Abbildung 34).

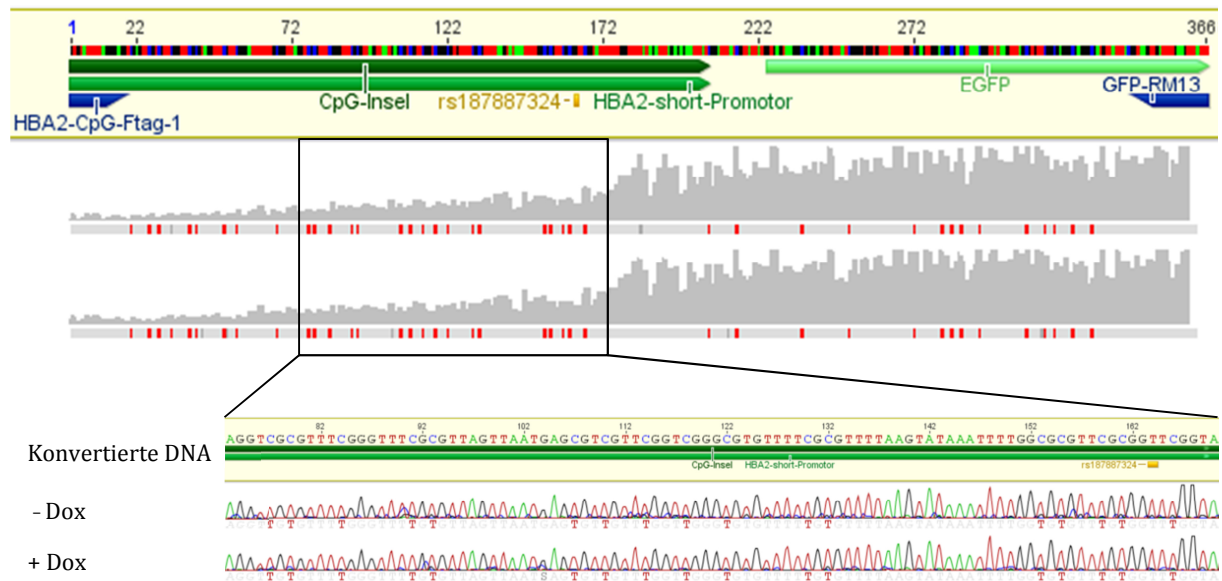


Abbildung 34: Methylierungsanalyse des *HBA2*-Testpromotors nach 14-tägiger Behandlung der Zelllinie *HBA2-short_AS* mit Doxycyclin. Der obere Abschnitt der Abbildung zeigt eine Übersicht über den für die Methylierungsanalyse ausgewählten Bereich. Die *Primer* (blau), welche für die Analyse eingesetzt wurden, binden im *EGFP*-Reportergen (hellgrün) sowie in der Promotorregion von *HBA2* (grün) und ermöglichen die partielle Analyse der CpG-Insel (dunkelgrün) mit dem in der Sequenz vorhandenen SNP rs187887324 (gelb). Darunter sind die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung von Bisulfit-behandelter genomischer DNA von unbehandelten Zellen (- Dox) und für 14 Tage mit Doxycyclin behandelten Zellen (+ Dox) dargestellt. Die bei einer Methylierung der CpG-Dinukleotide erwartete, konvertierte DNA-Sequenz ist im oberen Teil des Ausschnitts dargestellt. Sowohl die Ergebnisse der Kontrollen, als auch die der behandelten Zellen weisen im Bereich der CpG-Dinukleotide ein Thymin anstelle eines Cytosins auf. Somit lagen die CpG-Dinukleotide in den Zellen nicht methyliert vor.

Im Gegensatz zur Hochdurchsatz-Bisulfit-Sequenzierung konnten die Sequenzen für den *MSH2*-Testpromotor mit der Sanger-Sequenzierungsmethode nicht von denen des endogenen Promotors unterschieden werden. Die für die Analyse verwendeten *Primer* binden beide im Bereich des *MSH2*-Testpromotors und somit auch im endogenen *MSH2*-Promotor. Im Gegensatz zur Hochdurchsatz-Bisulfit-Sequenzierung war es mit der Sanger-Sequenzierungsmethode nicht möglich die Ergebnisse des Testpromotors anhand des in der Sequenz vorhandenen Basenaustausches zu unterscheiden. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass vermutlich sowohl der Testpromotor als auch der endogene Promotor in den mit Doxycyclin behandelten Zellen unmethyliert vorlag. Wäre der *MSH2*-Testpromotor methyliert gewesen, so müsste das Elektropherogramm im Bereich der CpG-Dinukleotide zumindest ein schwaches Signal für Cytosin aufweisen, auch wenn der endogene Promotor unmethyliert vorlag. Das Elektropherogramm zeigt an diesen Stellen jedoch nur eindeutige Signale für Thymin (Abbildung 35).

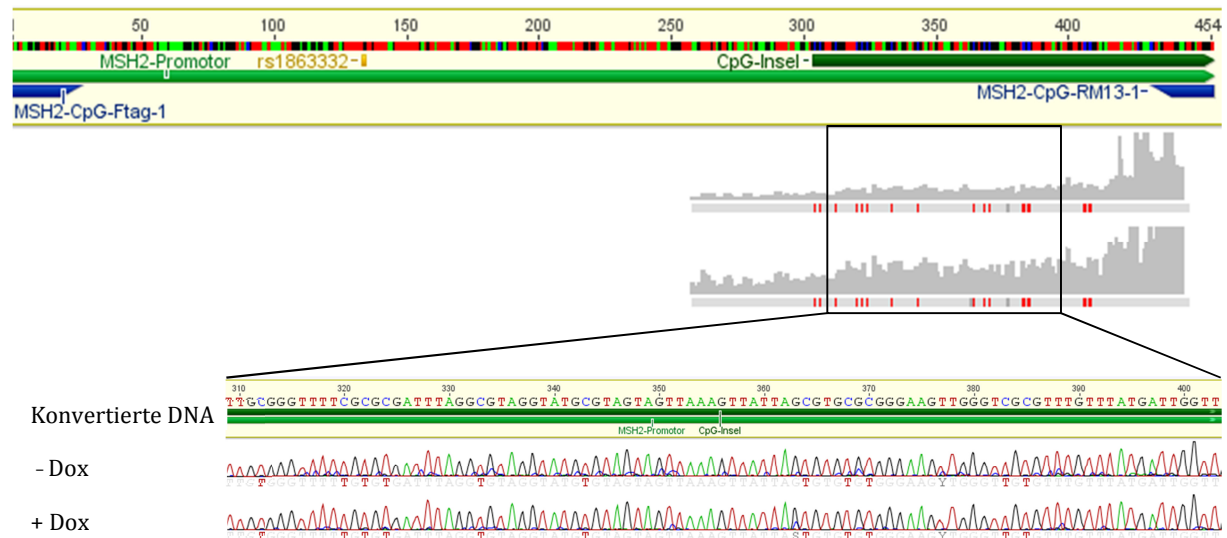


Abbildung 35: Ergebnis der Methylierungsanalyse des *MSH2*-Promotors nach 14-tägiger Behandlung der Zelllinie *MSH2_Sense* mit Doxycyclin. Eine Übersicht über den für die Methylierungsanalyse ausgewählten Bereich ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Die für die Methylierungsanalyse verwendeten *Primer* (blau) binden beide in der Promotorregion von *MSH2* (grün) und ermöglichen die Analyse der CpG-Insel. Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung können jedoch nicht anhand des SNPs rs1863332 (gelb) des *MSH2*-Testpromotors von denen des endogenen *MSH2*-Promotors der Zelllinie unterschieden werden. Im unteren Teil der Abbildung sind die Elektropherogramme der Sanger-Sequenzierung von Bisulfit-behandelter genomischer DNA der unbehandelten Zellen (- Dox) und für 14 Tage mit Doxycyclin behandelten Zellen (+ Dox) dargestellt. Ein Ausschnitt zeigt die bei einer Methylierung der CpG-Dinukleotide erwartete, konvertierte DNA-Sequenz und die Ergebnisse der behandelten und unbehandelten Zellen. Im Bereich der CpG-Dinukleotide ist auf den Elektropherogrammen ein Thymin anstelle eines Cytosins zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass die CpG-Dinukleotide des *MSH2*-Testpromotors und des endogenen *MSH2*-Promotors sowohl in den unbehandelten als auch in den behandelten Zellen nicht methyliert vorlagen.

3.2.10 Aktivität der Testpromotoren nach beendeter Induktion der überlappenden Transkription

Da die Testpromotoren sowohl durch eine 24-stündige als auch eine 14-tägige Induktion der überlappenden Transkription keine Methylierungsänderung zeigten, wurde angenommen, dass die Testpromotoren dabei nicht stabil inaktiviert werden. Daher wurde im nachfolgenden Experiment untersucht, ob die durch die überlappende Transkription hervorgerufene Abnahme der *EGFP*-Expression reversibel ist, wenn die Doxycyclin-Induktion und die damit verbundene überlappende Transkription beendet wurde.

Die qRT-PCR-Ergebnisse in Kapitel 3.2.8 zeigten für *MSH2_Sense* einen im Vergleich zu den anderen Zelllinien weniger signifikanten Effekt der Abnahme der *EGFP*-Expression und die Ergebnisse der einzelnen Klone unterschieden sich dabei deutlich stärker. Aus diesen Gründen konzentrierte sich das folgende Experiment auf die Zelllinien *UBE3A_AS*, *HBA2-short_AS* und *HBA2-long_AS*.

Jeweils drei Klone der jeweiligen Zelllinie wurden für drei Tage mit Doxycyclin behandelt, anschließend gewaschen und weitere drei Tage in Doxycyclin-freiem Medium kultiviert. Für das Experiment wurde Medium mit Tetracyclin-freiem FBS verwendet und die RNA-Extraktion erfolgte mit dem *AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit*. Die Analyse des Experiments erfolgte mittels qRT-PCR und für die Normalisierung der Daten wurde *GAPDH* als Referenzgen verwendet. Wie bereits für die anderen Experimente beschrieben, wurde für jeden Zellklon eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt und die hierfür berechneten Ergebnisse auf eins gesetzt. Für jeden der untersuchten Zellklone wurde das Experiment jeweils zweimal durchgeführt.

Die Ergebnisse für die Zelllinie *UBE3A_AS* zeigen, dass in allen drei untersuchten Zellklonen nach Induktion des *CMV*-Promotors mit Doxycyclin die erwartete Zunahme der Exon_2/3-Expression und Abnahme der *EGFP*-Expression erfolgte. Anschließend, nach Beendigung der induzierten überlappenden Transkription, wurden sowohl Exon_2/3 als auch *EGFP* in den zuvor mit Doxycyclin behandelten Zellen in ähnlicher Höhe wie in den unbehandelten Kontrollen exprimiert. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die überlappende Transkription keine stabile Inaktivierung des *UBE3A*-Testpromotors erfolgte und die hervorgerufene Abnahme der *EGFP*-Expression reversibel ist (Abbildung 36).

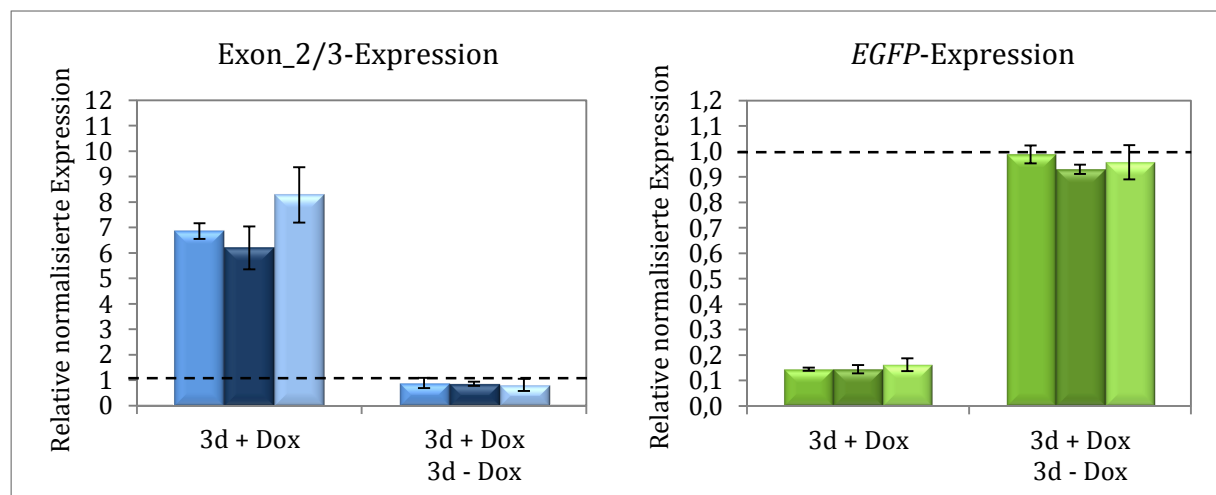


Abbildung 36: Ergebnis der qRT-PCR-Analyse für die Zelllinie *UBE3A_AS* nach beendeter Induktion. Dargestellt sind die qRT-PCR-Ergebnisse für Exon_2/3 (blau) und *EGFP* (grün), die anhand der *GAPDH*-Expression normalisiert wurden. Durch eine dreitägige Induktion der überlappenden Transkription mit Doxycyclin zeigten die behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (gestrichelte Linie), die erwartete Zunahme der Exon_2/3-Expression und Abnahme der *EGFP*-Expression. Nach der Kultivierung der behandelten Zellen für weitere drei Tage in Medium ohne Doxycyclin entsprach die Exon_2/3- und *EGFP*-Expression in den zuvor behandelten Zellen der Kontrollen. Dargestellt sind Ergebnisse von drei verschiedenen Klonen der Zelllinie *UBE3A_AS*, mit denen das Experiment jeweils zweimal durchgeführt wurde.

Auch in den Zelllinien *HBA2-short_AS* (Abbildung 37) und *HBA2-long_AS* (Abbildung 38) wurde, wie erwartet, durch Induktion der überlappenden Transkription die Expression von Exon_2/3 gesteigert und die *EGFP*-Expression gehemmt. Nach Wegnahme des Doxycyclins war die Expression von Exon_2/3 und *EGFP*, ebenso wie bei *UBE3A_AS*, vergleichbar zu der in den unbehandelten Kontrollen.

Somit konnte für alle drei untersuchten Zelllinien gezeigt werden, dass die Abnahme der *EGFP*-Expression, welche durch die Induktion der überlappenden Transkription hervorgerufen wird, reversibel ist. Die Zelllinien zeigten eine zu den unbehandelten Kontrollen vergleichbare Expression von Exon_2/3 und *EGFP*, nachdem die Induktion der überlappenden Transkription beendet wurde. Diese Ergebnisse bestätigen, dass durch die überlappende Transkription keine stabile Inaktivierung der Testpromotoren im etablierten Zellkulturmodell hervorgerufen wird.

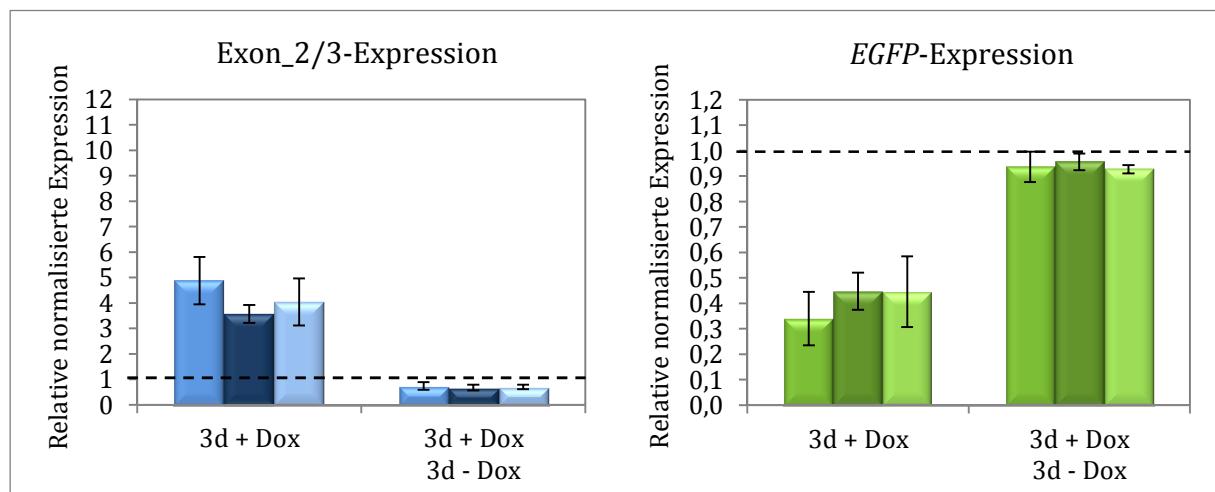


Abbildung 37: Ergebnis der Exon_2/3- und *EGFP*-Expression in *HBA2-short_AS*-Zellen nach beendeter Induktion. Der linke Bereich der Abbildung zeigt die qRT-PCR-Ergebnisse der Exon_2/3-Expression (blau), der rechte die Ergebnisse der *EGFP*-Expression (grün). Die Induktion der überlappenden Transkription durch dreitägige Zugabe von Doxycyclin führte zur erwarteten Zunahme der Exon_2/3-Expression und Abnahme der *EGFP*-Expression im Vergleich zu den Kontrollen (gestrichelte Linie). Nach der Kultivierung der behandelten Zellen für weitere drei Tage in Medium ohne Doxycyclin entsprach die Exon_2/3- und *EGFP*-Expression in den zuvor behandelten Zellen der der Kontrollen. Für alle drei untersuchten Zellklone der Zelllinie *HBA2-short_AS*, wurde das Experiment insgesamt zweimal durchgeführt und die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen anhand der *GAPDH*-Expression normalisiert.

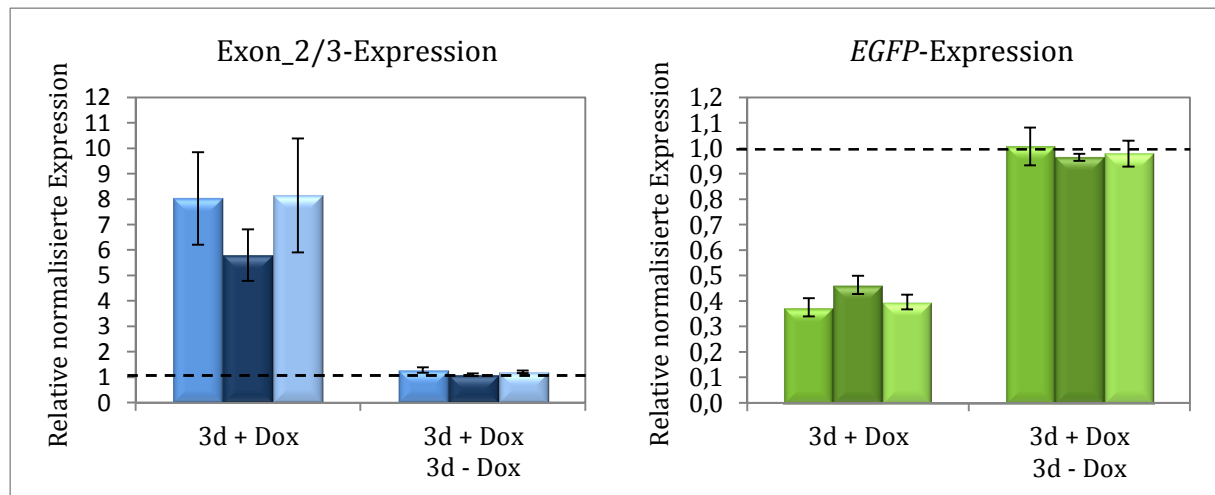


Abbildung 38: Ergebnis der qRT-PCR-Analyse für die Zelllinie *HBA2-long_AS* nach beendeter Induktion der überlappenden Transkription. Dargestellt sind die anhand der *GAPDH*-Expression normalisierten qRT-PCR-Ergebnisse für Exon_2/3 (blau) und *EGFP* (grün). Eine dreitägige Induktion der überlappenden Transkription mit Doxycyclin, rief in den behandelten Zellen die erwartete Zunahme der Exon_2/3-Expression und Abnahme der *EGFP*-Expression im Vergleich zu den Kontrollen (gestrichelte Linie) hervor. Nach der Beendigung der überlappenden Transkription und Kultivierung der behandelten *HBA2-long_AS*-Zellen für weitere drei Tage in Medium ohne Doxycyclin entsprach die Exon_2/3- und *EGFP*-Expression in den zuvor behandelten Zellen der der Kontrollen. Die Analyse erfolgte jeweils zweimal mit drei verschiedenen Klonen der Zelllinie *HBA2-long_AS*.

4 Diskussion

4.1 Transkriptabbruch der lncRNA *Snhg14* in murinen embryonalen Stammzellen

Zu Beginn dieses Projektes war bereits bekannt, dass die monoallelische Genexpression von *Ube3a* in Neuronen der Maus und des Menschen durch die lncRNA *Snhg14* hervorgerufen wird und dass die Transkription von *Snhg14* mit dem paternalen *Ube3a*-Gen überlappt (Numata et al. 2011; Meng et al. 2012). Der Regulationsmechanismus der monoallelischen *Ube3a*-Expression war zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht aufgeklärt und sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Durch Integration einer transkriptionellen Stoppkassette in das Genom von mES-Zellen sollte das paternale *Snhg14*-Transkript verkürzt und auf diese Weise eine mit dem *Ube3a*-Promotor überlappende Transkription verhindert werden. Die Integration der transkriptionellen Stoppkassette in das Genom der mES-Zellen sollte durch homologe Rekombination in Intron 1 von *Ube3a* erfolgen. Hierfür wurde ein Plasmid benötigt, welches die Stoppkassette und homologe Sequenzen zu Intron 1 beinhaltete. Trotz zahlreicher unterschiedlicher Herangehensweisen blieb die Klonierung dieses Plasmids jedoch erfolglos.

Die Homologieregion wurde so ausgewählt, dass sie möglichst wenige Wiederholungssequenzen aufwies. Intron 1 des *Ube3a*-Gens besteht jedoch zu 19,9 Prozent aus Wiederholungssequenzen und ist circa 11,7 Kilobasen lang. Aus diesem Grund ließen sich Wiederholungssequenzen in der circa sechs bis sieben Kilobasen umfassenden Homologieregion nicht vermeiden. Die klonierte Homologieregion wies daher 15,4 Prozent Wiederholungssequenzen und einen Adenin- und Thymin-Gehalt von 67,5 Prozent auf (*UCSC Genome Browser, Mouse* NCBI37/mm9). Diese Faktoren könnten zu den Schwierigkeiten bei der Klonierung geführt haben. Superhelikaler Stress bei zirkulären Plasmiden kann, insbesondere im Bereich von Wiederholungssequenzen, zu Sekundärstrukturen führen, die von *E. coli* rekombiniert oder deletiert werden (Godiska et al. 2010). Bei dem Versuch die Stoppkassette in das Plasmid mit den Homologiefragmenten zu klonieren, zeigten die von den Bakterien aufgenommenen Plasmide, nach der Durchführung eines Restriktionsendonukleaseverdaus, nicht das erwartete DNA-Fragmentmuster des Zielpasmids. Viele der beobachteten Muster ließen auf ein kleineres Plasmid schließen, stimmten aber auch nicht mit dem erwarteten Muster für das Ausgangsplasmid überein. Zusätzlich dazu wurden manche Muster auch wiederholt beobachtet. Es ist daher davon auszugehen, dass bestimmte Bereiche des Plasmids von

E. coli deletiert wurden. Daran änderte die Verwendung eines speziell für die Klonierung solcher Sequenzen entwickelten Bakterienstamms ebenfalls nichts. Auch der erhöhte Gehalt an Adenin- und Thymin-Nukleotiden könnte die Klonierung erschwert haben, da AT-reiche Sequenzen allgemein schwieriger zu klonieren sind (Godiska et al. 2010). Zudem hatte das Plasmid mit den Homologiefragmenten bereits eine Größe von 8,7 Kilobasen und die Integration der Stoppkassette hätte weitere 4,7 Kilobasen hinzugefügt. Die Größe des Plasmids könnte daher ebenfalls zur schlechten Effizienz und der letztendlich erfolglosen Klonierung beigetragen haben.

Während der Klonierungsarbeiten erschien schließlich eine Veröffentlichung die den Regulationsmechanismus der monoallelischen *Ube3a*-Expression aufklärte. Durch Integration einer transkriptionellen Stoppkassette zwischen den snoRNAs *Snord115* und dem *Ube3a*-Gen konnte gezeigt werden, dass ein vorzeitiger Abbruch der lncRNA *Snhg14* die Stilllegung des paternalen *Ube3a*-Transkripts tatsächlich verhindert. Zudem bestätigte die Studie die Hypothese, dass die Expression des paternalen *Ube3a*-Gens durch transkriptionelle Interferenz gehemmt wird. Mithilfe von strangspezifischen qRT-PCR-Analysen wurde die paternale *Ube3a*-Expression in Kortexen transgener Mäuse mit deletiertem maternalen *Ube3a*-Allel untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das paternale *Ube3a*-Transkript in Intron 4 des *Ube3a*-Gens abbricht. Als TI-Mechanismus wurde eine Kollision der RNA-Polymerasen von *Snhg14* und *Ube3a* vorgeschlagen (Meng et al. 2013).

Da der Regulationsmechanismus der monoallelischen *Ube3a*-Expression auf diese Weise aufgeklärt wurde, wurde das Projekt der vorliegenden Arbeit trotz erfolgreicher Differenzierung der mES-Zellen in neuronale Zellen eingestellt.

4.2 Etablierung eines induzierbaren Zellkulturmodells zur Untersuchung von TI

4.2.1 Voraussetzungen für die Untersuchung von TI in Flp-In™-T-REx™-293-Zellen

Für die Untersuchung von TI und ihrer Auswirkung auf humane Promotoren wurde in der vorliegenden Arbeit ein induzierbares Zellkulturmodell mit den Promotoren der Gene *UBE3A*, *HBA2* und *MSH2* etabliert. Hierfür wurde das humane Flp-In™-T-REx™-293-System verwendet. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass es einen induzierbaren Promotor umfasst und daher eine gezielte Induktion der überlappenden Transkription für einen bestimmten Zeitraum ermöglicht. Daher konnten auch Auswirkungen auf die Genexpression nach beendeter Induktion der überlappenden Transkription untersucht werden.

Die Aktivität des induzierbaren *CMV*-Promotors des Flp-In™-T-REx™-293-Systems nimmt sowohl durch die Zugabe von Doxycyclin als auch Tetracyclin zu. Das System beruht darauf, dass die Flp-In™-T-REx™-293-Zellen einen Tet-Repressor exprimieren, der in Abwesenheit von Doxycyclin bzw. Tetracyclin als Homodimer an die Sequenzen des Tet-Operators 2 (TetO₂) bindet. Diese Bindung des Tet-Repressors verhindert die Transkription des minimalen *CMV*-Promotors. Wenn jedoch Doxycyclin bzw. Tetracyclin an den Tet-Repressor bindet, erfolgt eine Konformationsänderung des Homodimers, die zur Dissoziation des Tet-Repressors vom Operator führt. Dies erlaubt schließlich die Transkription vom *CMV*-Promotor und ermöglichte damit eine gezielte Induktion der überlappenden Transkription im etablierten Zellkulturmodell (*Flp-In™ T-REx™ Core Kit Manual*, Thermo Fisher Scientific).

Um das System für Untersuchungen der TI nutzen zu können, musste zuerst ein Effekt von Doxycyclin auf die Aktivität der Testpromotoren ausgeschlossen werden. Daher wurde die Aktivität der Testpromotoren nach Zugabe von Doxycyclin in transient transfizierten Flp-In™-T-REx™-293-Zellen mithilfe des Luciferase-Reportersystems bestimmt. Es zeigte sich, dass die Aktivität der Testpromotoren nach Zugabe von Doxycyclin zwar tendenziell niedriger war, die Abweichung jedoch innerhalb der Standardabweichung lag und somit nicht signifikant war. Diese Ergebnisse werden durch *Microarray*-Analysen gestützt, bei denen die Doxycyclin-induzierte Expression des Gens *NPAP1* (engl. *nuclear pore associated protein 1*) in stabil transfizierten Flp-In™-T-REx™-293-Zellen ausschließlich zu einer erhöhten Transkription von *NPAP1* führte. Für *UBE3A*, *HBA2*, *MSH2* und das für die qRT-PCR-Analysen verwendete Referenzgen *GAPDH* erfolgte keine signifikante Änderung der Transkription durch die Zugabe von Doxycyclin (Neumann et al. 2012).

In dem etablierten Zellkulturmodell steuert der *CMV*-Promotor die Transkription von Exon_2/3. Die Zelllinie *Basic_Vector* beinhaltet den *CMV*-Promotor und Exon_2/3, besitzt

jedoch im Vergleich zu den *Sense*- und *Antisense*-Zelllinien in Intron 2 kein integriertes Minigen. Mithilfe dieser Zelllinie sollte untersucht werden, ob die *EGFP*-Expression des Minigens einen Einfluss auf die Exon_{2/3}-Expression hat. Es zeigte sich, dass durch die Induktion des *CMV*-Promotors eine Steigerung der Exon_{2/3}-Expression hervorgerufen werden konnte, die vergleichbar zu der der *Sense*- und *Antisense*-Zelllinien war. Daher ist ein Effekt des Minigens auf die Expression des *CMV*-Promotors unwahrscheinlich. Die Ergebnisse zeigen allerdings, dass der *CMV*-Promotor auch ohne die Zugabe von Doxycyclin oder Tetracyclin in den Flp-InTM-T-RExTM-293-Zellen aktiv ist. Durch die Induktion mit Doxycyclin ist die Aktivität des *CMV*-Promotors jedoch circa fünfmal stärker als diese Basalaktivität. Daher konnte in den nachfolgenden Experimenten für die *Sense*- und *Antisense*-Zelllinien trotzdem ein signifikanter Effekt durch Induktion der überlappenden Transkription nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der *Sense*- und *Antisense*-Zelllinien zeigten auch, dass die Induktion der Exon_{2/3}-Expression sowohl zwischen den Zelllinien als auch den Klonen der gleichen Zelllinie variieren kann. Dies wurde ebenfalls für andere Zelllinien des Flp-InTM-T-RExTM-293-Systems beobachtet (Masterarbeit N. Utz 2015, Dissertation T. Berulava 2012). Konsistentere Ergebnisse konnten durch den Gebrauch von Tetracyclin-freiem FBS erzielt werden. Durch die Zugabe des Antibiotikums Tetracyclin zum Tierfutter, kann das aus Kälbern isolierte FBS Tetracyclin enthalten. Für die ersten Experimente wurde FBS verwendet, welches vom Hersteller nicht explizit auf die Abwesenheit von Tetracyclin getestet wurde. Es wurde zwar darauf geachtet, dass sowohl die mit Doxycyclin behandelten als auch die unbehandelten Kontrollen im gleichen Ausgangsmedium kultiviert wurden, das FBS könnte sich jedoch vor allem für verschiedene Klone und Zeitpunkte aufgrund unterschiedlicher FBS-Chargen unterscheiden haben. Somit könnte das verwendete FBS zur größeren Streuung der qRT-PCR-Ergebnisse bei den ersten Experimenten geführt haben (*Flp-InTM T-RExTM Core Kit Manual*, Thermo Fisher Scientific). Für Untersuchungen mit dem etablierten Zellkulturmodell ist es daher entscheidend, dass die Zellen in Medium mit Tetracyclin-freiem FBS kultiviert werden.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass sich für die qRT-PCR-Analysen das *AllPrep[®] DNA/RNA/Protein Mini Kit* zur RNA-Extraktion besser eignete als *TRIzol[®]*. Die Integrität der RNA und auch Rückstände des für die Extraktion mit *TRIzol[®]* verwendeten Phenols, können qRT-PCR-Analysen negativ beeinflussen (Nolan et al. 2006; Vermeulen et al. 2011). Zudem wird bei der RNA-Extraktion mit *TRIzol[®]*, im Vergleich zum *AllPrep[®] DNA/RNA/Protein Mini Kit*, ein höherer Gehalt an kleinen RNAs (kleiner als 200 Nukleotide) und ungespleißten, Intron-haltigen Transkripten aufgereinigt (Sultan et al. 2014). Da mit den

qRT-PCR-Analysen insbesondere gespleißte mRNA-Transkripte detektiert werden sollten, ist der Gebrauch des *Kits* demnach geeigneter für das etablierte Zellkulturmodell gewesen.

4.2.2 Die Zelllinie *UBE3A_AS* zeigt den stärksten Effekt durch TI

4.2.2.1 Der *UBE3A*-Testpromotor ist in Flp-In™-T-REx™-293-Zellen aktiv

Der *UBE3A*-Promotor wurde für das Projekt ausgewählt, da Studien in der Maus zeigten, dass TI an der Regulation der monoallelischen *Ube3a*-Expression in Neuronen beteiligt ist (Meng et al. 2013).

Beim Menschen wird das *UBE3A*-Gen in sehr vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert und auch in der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 konnte eine Expression dieses Gens nachgewiesen werden (Neumann et al. 2012; Uhlen et al. 2015). Daher wurde für die ausgewählte putative *UBE3A*-Testpromotorregion ebenfalls eine Aktivität in Flp-In™-T-REx™-293-Zellen erwartet und mithilfe des Luciferase-Reportersystems bestätigt. Die Promotoraktivitätsanalyse erfolgte mit zwei verschiedenen putativen *UBE3A*-Promotoren, die sich in ihrer Sequenz ausschließlich in einer Base vom Wildtyp-Promotor unterscheiden. Der Basenaustausch erlaubte bei nachfolgenden Analysen die Unterscheidung des *UBE3A*-Testpromotors vom endogenen Promotor der Zelllinie. Da der Basenaustausch jedoch in beiden Promotorsequenzen keinem natürlich vorkommenden SNP entsprach, wurde die Promotoraktivitätsanalyse sowohl mit den beiden Promotoren als auch mit dem Wildtyp-Promotor durchgeführt. Auf diese Weise wurden mögliche, durch den Basenaustausch hervorgerufene, Aktivitätsunterschiede zum Wildtyp-Promotor ausgeschlossen. Alle drei Promotoren zeigten in der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 eine vergleichbare Aktivität, weshalb einer der Promotoren mit Basenaustausch für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendet wurde.

Bei der nachfolgenden Promotoraktivitätsanalyse, die den Einfluss von Doxycyclin auf die Promotoraktivität klären sollte, wurde für den ausgewählten *UBE3A*-Testpromotor sowohl für die Kontrollen als auch für die mit Doxycyclin behandelten Zellen nur eine circa halb so hohe Aktivität wie bei den vorangegangenen Analysen, gemessen. Während der *UBE3A*-Testpromotor bei der ersten Analyse die stärkste Aktivität von allen untersuchten Testpromotoren zeigte, lag diese bei der zweiten Analyse nur noch im Bereich des *HBA2-short*-Testpromotors. Dabei könnte es sich um eine Schwankung im biologischen Replikat handeln. Da der Versuchsablauf des Experiments für die unbehandelten Kontrollen jedoch identisch mit dem zuvor durchgeführten Experiment war und sich die Zellen nur in der Höhe ihrer Passage unterschieden, könnte dies vielleicht auch einen Einfluss auf die Promotoraktivität gehabt haben. Vermehrtes Passagieren der Zellen kann zu einer positiven

Selektion schnellwachsender Zellen führen, die sich in ihrer Genexpression von den übrigen Zellen der Ausgangszelllinie unterscheiden (Hughes et al. 2007). Die Höhe der Passage kann somit auch einen Einfluss auf die Ergebnisse von Promotoraktivitätsanalysen haben.

4.2.2.2 Die Zelllinie *UBE3A_AS* zeigt durch die induzierte überlappende Transkription eine Abnahme der *EGFP*-Expression

Nach der Herstellung stabiler *UBE3A_AS*-Zelllinien wurde der *CMV*-Promotor durch die Zugabe von Doxycyclin induziert und die *EGFP*-Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-Mikroskopie bestimmt. Für die Zelllinie *UBE3A_AS* konnte zwar nur eine schwache *EGFP*-Fluoreszenz detektiert werden, diese war in den mit Doxycyclin behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen jedoch noch geringer (Daten sind nicht gezeigt). Da die *EGFP*-Expression durch den Testpromotor kontrolliert wird und zuvor nachgewiesen werden konnte, dass Doxycyclin keinen Einfluss auf die Aktivität der Testpromotoren hat, wurde die schwächere *EGFP*-Fluoreszenz somit durch die Induktion der überlappenden Transkription hervorgerufen. Dies konnte mit den nachfolgenden qRT-PCR-Analysen bestätigt werden.

Es zeigte sich, dass die Zugabe von Doxycyclin zu einer siebenfachen Zunahme der Exon_2/3-Expression führte und eine sechsfache Abnahme der *EGFP*-Expression hervorrief. Somit konnte mit dem etablierten Zellkulturmodell durch Induktion der überlappenden Transkription zwischen Exon_2/3- und *EGFP*-Transkripten TI hervorgerufen werden.

Der TI-Effekt war bei der *UBE3A_AS*-Zelllinie, im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien, deutlich stärker ausgeprägt. Es wird vermutet, dass die durch den *UBE3A*-Testpromotor kontrollierte *EGFP*-Transkription generell sensitiver auf die überlappende Transkription reagiert. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass in der *UBE3A_AS*-Zelllinie, in der bereits ohne Zugabe von Doxycyclin eine überlappende Transkription erfolgt, sowohl die *EGFP*-Transkription als auch die detektierte *EGFP*-Fluoreszenz deutlich schwächer als erwartet ausfiel. Wie bereits beschrieben, zeigten die Promotoraktivitätsanalysen, die jedoch mit transient transfizierten Flp-In™-T-REx™-293-Zellen durchgeführt wurden, für den *UBE3A*-Testpromotor die stärkste oder eine zu *HBA2-short* vergleichbare Aktivität. In der stabilen *UBE3A_AS*-Zelllinie war die *EGFP*-Expression, verglichen mit der *HBA2-short_AS*-Zelllinie, jedoch deutlich schwächer. Es ist daher davon auszugehen, dass die *EGFP*-Transkription, die durch den *UBE3A*-Testpromotor gesteuert wird, sensitiver auf die überlappende Transkription reagiert und bereits durch die basale Aktivität des *CMV*-Promotors und die damit

verbundene überlappende Transkription gehemmt wird. Dieser Effekt wird durch die Induktion des *CMV*-Promotors dann noch verstärkt.

4.2.2.3 TI-Mechanismen, die in der etablierten Zelllinie *UBE3A_AS* zur Abnahme der *EGFP*-Expression führen könnten

Die *EGFP*-Transkription, welche durch den *UBE3A*-Testpromotor gesteuert wird, könnte, aufgrund des vorliegenden TI-Mechanismus, sensibler auf die überlappende Transkription reagieren. Für die Zelllinie *UBE3A_AS* sind verschiedene TI-Mechanismen im etablierten Zellkulturmodell denkbar. Da für den *UBE3A*-Testpromotor im Rahmen der Promotoraktivitätsanalysen eine starke Aktivität nachgewiesen werden konnte und auch der *CMV*-Promotor eine starke Aktivität besitzt, könnte die RNA-Polymerase-Kollision der vorherrschende TI-Mechanismus in der *UBE3A_AS*-Zelllinie sein. Die Abnahme der *EGFP*-Expression würde dabei durch eine Kollision der RNA-Polymerasen von Exon_2/3 und *EGFP* hervorgerufen werden. Dieser TI-Mechanismus spielt bei Transkripten, die in ähnlicher Stärke transkribiert werden, eine größere Rolle (Bordoy und Chatterjee 2015).

Die RNA-Polymerase-Kollision kann allerdings zum Abbruch beider beteiligter Transkripte führen (Prescott und Proudfoot 2002; Shearwin et al. 2005). Untersuchungen der Zelllinie *Basic_Vector* weisen jedoch darauf hin, dass die Exon_2/3-Expression durch die überlappende Transkription im etablierten Zellkulturmodell nicht beeinträchtigt wird. Die Höhe der Exon_2/3-Expression ist in der *Basic_Vector*-Zelllinie, in der keine überlappende Transkription stattfindet, vergleichbar zu der in den *Sense*- und *Antisense*-Zelllinien. Allerdings spiegelt die Zelllinie *Basic_Vector* nicht genau die Situation in den *Sense*- und *Antisense*-Zelllinien wider. Die Sequenzen der Minigene, die in den anderen Zelllinien im Gegensatz zum *Basic_Vector* vorhanden sind, könnten einen Einfluss auf die Exon_2/3-Expression haben. Um eine genau Aussage über die Exon_2/3-Expression in Abwesenheit der überlappenden Transkription in den Zelllinien treffen zu können, müsste daher die Exon_2/3-Expression in den *Sense*- und *Antisense*-Zelllinien mit jeweils mutiertem, funktionslosem Testpromotor analysiert werden.

Ein anderer möglicher TI-Mechanismus, der sich im Bereich des *EGFP*-Promotors ereignen könnte, ist die Promotor-Okklusion. Die RNA-Polymerasen von Exon_2/3 könnten hierbei über dem Testpromotor pausieren und dadurch die Bindestellen für den Initiationskomplex am Testpromotor verdecken. Dies könnte die Initiation der Transkription am Testpromotor behindern (Palmer et al. 2009; Palmer et al. 2011).

Ein weiterer TI-Mechanismus, der sich im Bereich von Promotoren ereignet, ist die „*Sitting-Duck*“-Interferenz. Bei diesem TI-Modell erfolgt die Initiation der Transkription am

sensitiven Promotor jedoch nur langsam (Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011). Da es sich bei dem *UBE3A*-Testpromotor allerdings um einen starken Promotor handelt, erscheint dieser TI-Mechanismus für die Zelllinie *UBE3A_AS* eher unwahrscheinlich.

Die Promotor-Konkurrenz, ebenso wie die Transkriptions-Blockade, können als TI-Mechanismen in der *UBE3A_AS*-Zelllinie ausgeschlossen werden. Für die Promotor-Konkurrenz müssten die RNA-Polymerase-Bindestellen des *CMV*-Promotors und des *UBE3A*-Testpromotors miteinander überlappen (Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011). Dies kann aufgrund der Distanz zwischen den Promotoren ausgeschlossen werden. Das TI-Modell der Transkriptions-Blockade wäre hingegen nur dann möglich, wenn die vom *UBE3A*-Testpromotor ausgehende Transkription über den *CMV*-Promotor erfolgen würde (Shearwin et al. 2005). Dies ist in dem etablierten Zellkulturmodell jedoch aufgrund der Anordnung des *CMV*-Promotors und des *EGFP*-Gens ebenfalls nicht der Fall. Der *CMV*-Promotor befindet sich nicht innerhalb des *EGFP*-Gens.

Welcher der genannten Mechanismen in der Zelllinie *UBE3A_AS* jedoch tatsächlich vorherrscht, soll in weiteren Experimenten geklärt werden.

4.2.3 Die Zelllinien *HBA2-short_AS* und *HBA2-long_AS* zeigen einen vergleichbaren TI-Effekt

4.2.3.1 In Flp-In™-T-REx™-293-Zellen zeigen die *HBA2*-Testpromotoren eine starke Aktivität

Der Promotor des α -Globingens *HBA2* wurde für die Etablierung des Zellkulturmodells ausgewählt, da in einem Patienten mit α -Thalassämie eine mit dem *HBA2*-Gen überlappende Transkription zur Inaktivierung und Promotor-Methylierung dieses Gens führte (Barbour et al. 2000; Tufarelli et al. 2003).

Die Expression des *HBA2*-Gens erfolgt beim Menschen Zelltyp-spezifisch in erythroiden Zellen des Knochenmarks (Uhlen et al. 2015). Mit *Microarray*-Analysen konnte in Flp-In™-T-REx™-293-Zellen jedoch ebenfalls eine schwache Expression dieses Gens nachgewiesen werden (Neumann et al. 2012). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich Flp-In™-T-REx™-293-Zellen sowohl in ihrem Karyotyp als auch auf DNA-Sequenzebene von normalen menschlichen Zellen unterscheiden. Die Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 ist von HEK293-Zellen abgeleitet (*Growth and Maintenance of the Flp-In™ T-REx™ Cell Line User Guide*, Thermo Fisher Scientific). Die Herstellung der HEK293-Zellen erfolgte durch Transfektion humaner embryonaler Nierenzellen (HEK, engl. *human embryonic kidney cells*) mit DNA des humanen Adenovirus 5 (Graham et al. 1977). Diese hypotriploide Zelllinie diente als Ausgangszelllinie für die Herstellung der Flp-In™-T-REx™-293-Zellen, die an zwei

Stellen im Genom Integrationen aufweisen: an einer Position das Tet-Repressorgen zusammen mit einem Blasticidin-Resistenzgen und an einer anderen Position eine Kassette, die das *lacZ*-Zeocin-Resistenz-Fusionsgen und eine FRT-Rekombinationsstelle für die Integration des Zielgens umfasst (*Flp-In™ T-REx™ Core Kit Manual*, Thermo Fisher Scientific). Die genomischen Orte, an denen diese beiden Integrationen erfolgten, sind jedoch nicht bekannt. Durch eine aus der Hypotriploidie resultierenden veränderten Dosis von regulatorischen Faktoren könnte die Promotoraktivität des *HBA2*-Gens beeinflusst werden. Dies könnte die schwache Expression des *HBA2*-Gens erklären, die mit *Microarray*-Analysen in Flp-In™-T-REx™-293-Zellen nachgewiesen wurde (Neumann et al. 2012).

Die ausgewählten Promotorregionen von *HBA2* zeigten in diesen Zellen eine sehr starke Aktivität. Bei den qRT-PCR-Analysen wurde das von den *HBA2*-Testpromotoren kontrollierte *EGFP*-Gen in ähnlicher Höhe wie *GAPDH* exprimiert. Eine mögliche Erklärung für diese starke Aktivität könnte daher sein, dass die klonierten Promotorregionen bestimmte Elemente, die die Zelltyp-spezifische Expression von *HBA2* steuern, nicht beinhalten. Die humanen α -Globingene sind als Gruppe angeordnet und die Expression vieler solcher Gengruppen wird durch entfernt lokalisierte regulatorische Elemente kontrolliert, die mit den verwandten Promotoren der Gengruppe interagieren. Auch für die humanen α -Globingene konnte solch ein Regulationsmechanismus für vier regulatorische Elemente, die sich zehn bis 50 Kilobasen stromaufwärts der α -Globingene befinden, nachgewiesen werden. Die Interaktion dieser regulatorischen Elemente mit den α -Globingenen erfolgt Zelltyp-spezifisch in erythroiden Zellen und hängt insbesondere von einem dieser vier untersuchten Elemente ab. Eine Deletion dieses regulatorischen Elements HS_40 hemmt auch die Interaktion der anderen Elemente mit den α -Globingenen und somit die α -Globin-Genexpression (Vernimmen et al. 2009).

Die klonierten *HBA2*-Promotorregionen beinhalten diese weit entfernten, stromaufwärts der α -Globingene gelegenen regulatorischen Elemente nicht. Dies könnte erklären, weshalb die klonierten *HBA2*-Promotorregionen in Flp-In™-T-REx™-293-Zellen keine Zelltyp-spezifische Aktivität zeigen. Die Zelltyp-spezifische Regulation der Genexpression ist ein komplexes Zusammenspiel von aktivierenden und reprimierenden Faktoren. Die α -Globingenregion könnte reprimierende Elemente umfassen, die eine Stimulation der Genexpression überhaupt erst erforderlich machen. Falls diese reprimierenden Elemente in den klonierten Promotorregionen nicht vorhanden sind, ist eine Zelltyp-spezifische Stimulation der Promotoraktivität eventuell nicht erforderlich. Die klonierten Promotorregionen wären dann ausreichend für eine effiziente Initiation der Transkription.

Dies könnte die erhöhte Aktivität der klonierten *HBA2*-Promotorregionen in den Flp-In™-T-REx™-293-Zellen erklären.

Die Testpromotoren *HBA2-short* und *HBA2-long* zeigten bei den qRT-PCR-Analysen eine vergleichbare Aktivität, während die Analysen auf Proteinebene ein anderes Ergebnis lieferten. Bei der Luciferase-Aktivitätsanalyse wurde für die Promotorregion *HBA2-short* eine sechsmal höhere Aktivität als für die Region von *HBA2-long* bestimmt. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Testpromotoren umfasst *HBA2-long* jedoch nicht ausschließlich den Promotor von *HBA2* sondern auch noch Exon 1 und 2 sowie neun Basen von Exon 3 des *HBA2*-Gens (UCSC Genome Browser, Human GRCh37/hg19, chr16:221,701-223,479). Da die *HBA2-long*-Sequenz für die Promotoraktivitätsanalyse stromaufwärts des Luciferasegens ins Leseraster passend kloniert wurde, wurde vermutlich ein Fusionsprotein aus der Luciferase und einer partiellen α -Globin-Polypeptidkette gebildet. Die partielle α -Globin-Polypeptidkette könnte die Aktivität des Luciferase-Enzyms aus sterischen Gründen gehemmt haben, was sich dann in einer geringeren Lumineszenzentwicklung äußerte. Auch stromaufwärts des *EGFP*-Gens wurde die *HBA2-long*-Sequenz passend ins Leseraster kloniert, was vermutlich zu einem Fusionsprotein aus dem EGFP-Protein und der partiellen α -Globin-Polypeptidkette führte. Daher könnte auch bei der Detektion der EGFP-Fluoreszenz die Klonierung dieser zusätzlichen Sequenz eine Rolle gespielt haben. Es ist denkbar, dass hierdurch Spleißeffekte auftraten, sodass zusätzlich zu dem erwarteten Leseraster ein alternatives Leseraster für die Proteinsynthese genutzt wurde und auf diese Weise weniger funktionale EGFP-Fusionsproteine synthetisiert wurden.

4.2.3.2 Durch Induktion der überlappenden Transkription erfolgt in den Zelllinien *HBA2-short_AS* und *HBA2-long_AS* eine Abnahme der *EGFP*-Expression

Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie wurde für die Zelllinie *HBA2-short_AS* in den mit Doxycyclin behandelten Zellen eine schwächere EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen als in den unbehandelten Kontrollen. Für *HBA2-long_AS* konnte eine ähnliche Tendenz beobachtet werden, die EGFP-Fluoreszenz war in dieser Zelllinie jedoch generell deutlich schlechter zu detektieren (Daten sind nicht gezeigt).

Die daraus abgeleitete Annahme, dass die verminderte EGFP-Fluoreszenz durch eine überlappende Transkription zwischen Exon_{2/3}- und *EGFP*-Transkripten hervorgerufen wurde, konnte mit qRT-PCR-Analysen bestätigt werden. Diese zeigten, dass durch eine sieben- bis achtfache Induktion der Exon_{2/3}-Expression eine dreifache Abnahme der *EGFP*-Expression in den Zelllinien *HBA2-short_AS* und *HBA2-long_AS* erfolgte. Im etablierten

Zellkulturmodell führt somit auch bei diesen beiden Zelllinien die Induktion der überlappenden Transkription zur TI.

Da die Promotorregion *HBA2-short* im Gegensatz zu *HBA2-long* nur einen Teil der CpG-Insel beinhaltet, beide *HBA2_AS*-Zelllinien jedoch einen vergleichbaren TI-Effekt zeigten, scheint, zumindest für *HBA2*, nicht die gesamte CpG-Insel für den TI-Effekt erforderlich zu sein.

4.2.3.3 Mechanismen, die in den etablierten Zelllinien *HBA2-short_AS* und *HBA2-long_AS* zur TI führen könnten

Da die Stärke des TI-Effekts in der *HBA2-short_AS*- und *HBA2-long_AS*-Zelllinie vergleichbar war, könnte der TI-Effekt in beiden Zelllinien durch den gleichen Mechanismus erfolgt sein. Die Promotoraktivitätsanalysen zeigten für beide Testpromotoren eine starke Aktivität, weshalb auch in den Zelllinien *HBA2-short_AS* und *HBA2-long_AS* die RNA-Polymerase-Kollision der vorherrschende TI-Mechanismus sein könnte. Im Vergleich zur Zelllinie *UBE3A_AS*, könnte sich der Kollisionspunkt der RNA-Polymerasen aber vielleicht näher am 3'-Ende des *EGFP*-Gens befinden. In beiden *HBA2_AS*-Zelllinien wurden eine deutlich stärkere *EGFP*-Expression und ein geringerer TI-Effekt, als in der *UBE3A_AS*-Zelllinie, beobachtet. Es erscheint wahrscheinlicher, dass bei einem Kollisionspunkt, der sich in der Nähe des 3'-Endes des *EGFP*-Gens befindet, mehr vollständige *EGFP*-Transkripte gebildet werden. Hierüber ist allerdings bisher nichts bekannt.

Wie bereits erwähnt, weisen die Ergebnisse der Zelllinie *Basic_Vector* darauf hin, dass die Exon_{2/3}-Expression durch die überlappende Transkription im etablierten Zellkulturmodell nicht beeinträchtigt wird. Eine Kollision der RNA-Polymerasen kann jedoch zum Abbruch beider Transkripte führen (Prescott und Proudfoot 2002; Shearwin et al. 2005). Die RNA-Polymerasen von Exon_{2/3} könnten daher entweder die Transkription nach der Kollision entlang des *EGFP*-Gens trotzdem fortsetzen oder aber der TI-Mechanismus ereignet sich eher im Bereich des *EGFP*-Promotors, wobei es zur Promotor-Okklusion oder „*Sitting-Duck*“-Interferenz kommen könnte. Die Promotor-Okklusion könnte durch ein Pausieren der RNA-Polymerasen von Exon_{2/3} über dem jeweiligen Testpromotor hervorgerufen werden. Da die integrierten Testpromotoren der beiden Zelllinien eine starke Aktivität aufweisen und eine relativ hohe Exon_{2/3}-Expression hervorrufen, erscheint die „*Sitting-Duck*“-Interferenz jedoch eher unwahrscheinlich. Dieser TI-Mechanismus spielt eine größere Rolle, wenn die Initiation der Transkription am sensitiven Promotor nur langsam erfolgt und sich die Aktivität der interferierenden Promotoren stark unterscheidet (Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011; Bordoy und Chatterjee 2015).

Sowohl die Promotor-Konkurrenz als auch die Transkriptions-Blockade können für die *HBA2_AS*-Zelllinien aus den bereits für die Zelllinie *UBE3A_AS* genannten Gründen ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 4.2.2.3).

4.2.4 In der *Sense*-Zelllinie *MSH2* ist der TI-Effekt am schwächsten

4.2.4.1 Die Aktivität des *MSH2*-Testpromotors ist in der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 niedrig

Die Auswahl des *MSH2*-Promotors für die Etablierung des Zellkulturmodells erfolgte ebenfalls basierend auf Patientenstudien, die eine durch überlappende Transkription ausgelöste Inaktivierung der *MSH2*-Expression zeigten (Ligtenberg et al. 2009; Ligtenberg et al. 2013).

Das *MSH2*-Gen wird beim Menschen in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, weshalb für die ausgewählte *MSH2*-Promotorregion in Flp-In™-T-REx™-293-Zellen ebenfalls eine Aktivität erwartet und bestätigt wurde (Uhlen et al. 2015). Bei der Promotoraktivitätsanalyse zeigte der *MSH2*-Testpromotor, verglichen mit den anderen untersuchten Testpromotoren, die schwächste Aktivität, vergleichbar mit der Aktivität der schwächeren Positivkontrolle *TRPS1*. Diese Ergebnisse werden von *Microarray*-Analysen mit Flp-In™-T-REx™-293-Zellen bestätigt, die eine vergleichbare Expression der Gene *TRPS1* und *MSH2* in diesen Zellen zeigten (Neumann et al. 2012).

Auch bei den nachfolgenden Untersuchungen zeigte der *MSH2*-Testpromotor, verglichen mit den anderen Testpromotoren, die schwächste Aktivität. Es konnte keine EGFP-Fluoreszenz für die Zelllinie *MSH2_Sense* bestimmt werden, da das *EGFP*-Gen hierfür zu schwach exprimiert wurde und auch bei den qRT-PCR-Analysen wurde nur eine schwache *EGFP*-Expression nachgewiesen.

4.2.4.2 Die Induktion der überlappenden Transkription korreliert in der Zelllinie *MSH2_Sense* mit einer Abnahme der *EGFP*-Expression

Nach der Optimierung des Protokolls für die Untersuchung von TI im etablierten Zellkulturmodell, konnte auch für die Zelllinie *MSH2_Sense* nach Induktion der überlappenden Transkription eine Abnahme der *EGFP*-Expression nachgewiesen werden. Allerdings unterschieden sich die Ergebnisse der einzelnen Klone relativ stark voneinander, weshalb der Effekt, verglichen mit den *Antisense*-Zelllinien, im Durchschnitt schwächer ausfiel. Da sich die untersuchten Klone der Zelllinie *MSH2_Sense* auf DNA-Ebene nicht voneinander unterscheiden und sich daher auch in Expression und Reaktion auf die Induktion gleich verhalten sollten, ist die Ursache für die starke Streuung in dieser Zelllinie

unklar. Ein Grund für den, im Vergleich zu den *Antisense*-Zelllinien, schwächeren TI-Effekt könnte die Promotor-Orientierung sein. Im Gegensatz zu den anderen Zelllinien, sind die interferierenden Promotoren in der Zelllinie *MSH2_Sense* in Tandem-Orientierung angeordnet, weshalb sich der TI-Mechanismus von dem der *Antisense*-Zelllinien unterscheiden könnte. Bei einer Tandem-Promotoranordnung ist beispielsweise der Mechanismus der RNA-Polymerase-Kollision unwahrscheinlicher (siehe Kapitel 4.2.4.3) (Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011). Für alle Testpromotoren wurden sowohl *Sense*- als auch *Antisense*-Zelllinien hergestellt. Es wurde jedoch nur jeweils die Zelllinie untersucht, die die Situation imitiert, die in bestimmten Patienten oder Geweben zur TI führt. Ob die Promotor-Orientierung bei dem Effekt der TI im etablierten Zellkulturmodell eine Rolle spielt, könnte mit der jeweils anderen Zelllinie, die bisher nicht untersucht wurde, analysiert werden.

4.2.4.3 TI-Mechanismen, die in der etablierten Zelllinie *MSH2_Sense* die Reduktion der *EGFP*-Expression hervorrufen könnten

In allen durchgeführten Experimenten zeigte der *MSH2*-Testpromotor, verglichen mit den anderen Testpromotoren, die schwächste Aktivität. Daher ist im Gegensatz zu den *Antisense*-Zelllinien, für die Zelllinie *MSH2_Sense* die „*Sitting-Duck*“-Interferenz ein wahrscheinlicher TI-Mechanismus. Demnach könnte die Initiation am *MSH2*-Testpromotor langsam erfolgen und die vom *CMV*-Promotor herannahenden RNA-Polymerasen zur Dissoziation des Initiationskomplexes führen. Dies würde die Initiation der Transkription am *MSH2*-Testpromotor hemmen (Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011).

Ein weiterer möglicher TI-Mechanismus für die Zelllinie *MSH2_Sense* wäre jedoch auch die Promotor-Okklusion in Kombination mit einem Pausieren der Exon_{2/3}-Polymerasen über dem Testpromotor, wie bereits für die *Antisense*-Zelllinien beschrieben (siehe Kapitel 4.2.2.3).

Dass die Abnahme der *EGFP*-Expression in der Zelllinie *MSH2_Sense* durch eine Kollision der RNA-Polymerasen von Exon_{2/3} und *EGFP* entlang des *EGFP*-Gens verursacht wird, ist eher unwahrscheinlich. Studien zeigten, dass die RNA-Polymerasen bei einer Kollision in *Sense*-Orientierung eher miteinander kooperieren und sich bei der Transkription unterstützen (Epshtein et al. 2003; Palmer et al. 2011; Hao et al. 2014).

Die Promotor-Konkurrenz und die Transkription-Blockade können für die Zelllinie *MSH2_Sense* aus den gleichen Gründen wie für die *Antisense*-Zelllinien ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 4.2.2.3).

4.2.5 Die Stärke des TI-Effekts ist im etablierten Zellkulturmodell abhängig vom integrierten Testpromotor

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen zeigen, dass die Induktion der überlappenden Transkription im etablierten Zellkulturmodell zur TI führt. Bei gleicher Promotor-Orientierung und ähnlich hoher Induktion des *CMV*-Promotors, konnte mit den *Antisense*-Zelllinien zudem beobachtet werden, dass der TI-Effekt im etablierten Modell vom integrierten Testpromotor abhängig ist. Für die Zelllinie *UBE3A_AS* konnte, im Vergleich zu den *HBA2_AS*-Zelllinien, ein stärkerer TI-Effekt nachgewiesen werden. Die Zelllinien *HBA2-short_AS* und *HBA2-long_AS*, die beide den *HBA2*-Promotor integriert haben, zeigten hingegen einen vergleichbaren TI-Effekt. Somit ist das Zellkulturmodell für die Untersuchung von TI durch konvergent angeordnete Promotoren geeignet.

TI konnte im etablierten Zellkulturmodell sowohl durch den schwachen *MSH2*-Testpromotor als auch die starken Testpromotoren *UBE3A*, *HBA2-short* und *HBA2-long* hervorgerufen werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Stärke des TI-Effekts in den etablierten Zelllinien daher nicht direkt mit der Aktivität der Testpromotoren korreliert sondern vielmehr durch unterschiedliche TI-Mechanismen dominiert wird. Während bei einem schwachen, sensitiven Promotor die „*Sitting-Duck*“-Interferenz eine größere Rolle spielt, kommt es zwischen starken Promotoren eher durch eine RNA-Polymerase-Kollision zur TI (Shearwin et al. 2005; Palmer et al. 2011; Bordoy und Chatterjee 2015).

4.2.6 Im etablierten Zellkulturmodell ist der TI-Effekt reversibel

Nach der Beobachtung der TI im etablierten Zellkulturmodell stellte sich die Frage, ob der TI-Effekt durch eine stabile Inaktivierung der Testpromotoren hervorgerufen wurde. Es zeigte sich jedoch, dass der TI-Effekt in den untersuchten Zelllinien reversibel ist und keine Methylierung der Testpromotoren erfolgte.

Für den *UBE3A*-Promotor deckt sich dies mit Daten, die zeigen, dass der *UBE3A*-Promotor auf dem paternalen Allel unmethyliert vorliegt, auch wenn die Expression von *UBE3A* gehemmt ist. Obwohl in Neuronen der Maus, aber auch des Menschen, eine mit dem paternalen *Ube3a*-Gen überlappende Transkription erfolgt, ist der *Ube3a*-Promotor auf beiden Allelen aktiv und liegt nicht methyliert vor (Numata et al. 2011; Meng et al. 2013). Dass die überlappende Transkription hierbei nicht zur Methylierung des paternalen *Ube3a*-Promotors führt, könnte daran liegen, dass sich der TI-Prozess vermutlich entlang des *Ube3a*-Gens und nicht direkt am *Ube3a*-Promotor ereignet. Für das murine *Ube3a*-Gen

wird angenommen, dass es in Intron 4 des *Ube3a*-Gens zu einer Kollision der RNA-Polymerasen kommt (Meng et al. 2013).

Ob TI zur Methylierung des beteiligten Promotors führt, könnte somit durch den vorliegenden TI-Mechanismus bedingt sein. Dieser wird durch Faktoren wie der Distanz der beteiligten Promotoren, aber auch deren Aktivität beeinflusst und könnte im etablierten Zellkulturmodell dazu geführt haben, dass keine Methylierung der Testpromotoren erfolgte (Sneppen et al. 2005; Palmer et al. 2011). In den *Antisense*-Zelllinien beträgt der Abstand zwischen dem *CMV*-Promotor und den Testpromotoren circa 1,2 Kilobasen, für die Zelllinie *MSH2_Sense* sogar nur circa 235 Basenpaare. Damit ist die Distanz zwischen den Promotoren im etablierten Zellkulturmodell deutlich geringer als in den Zellen der Patienten, bei denen eine überlappende Transkription zur Methylierung der Promotoren *HBA2* und *MSH2* führte (Tufarelli et al. 2003; Ligtenberg et al. 2009). Jedoch konnte auch mit einem transgenen Mausmodell gezeigt werden, dass *HBA2* durch die überlappende Transkription methyliert wird. Das Modell imitierte die Situation in der betroffenen Genregion des Patienten, bei dem ein verlängertes *LUC7L*-Transkript mit dem *HBA2*-Gen überlappt. Auch der Austausch des benachbarten *LUC7L*-Promotors (und dessen mutiertem Gen) durch den humanen Ubiquitin-C-Promotor führte zur Methylierung des *HBA2*-Promotors, obwohl der Abstand zwischen den Promotoren hierbei deutlich geringer als in den Patientenzellen war (Tufarelli et al. 2003).

Daher sind eventuell in den klonierten Promotorregionen auch bestimmte Elemente, die für eine Promotormethylierung durch TI benötigt werden, nicht vorhanden. Da nicht bekannt war, ob für den Prozess der TI die gesamte CpG-Insel des jeweiligen Gens erforderlich ist, wurden für den *HBA2*-Promotor zwei verschiedene Regionen für die Analysen ausgewählt. Während *HBA2-short* nur den Promotor umfasst, beinhaltet *HBA2-long* neben dem Promotor auch die gesamte CpG-Insel. Die Zelllinien beider Testpromotoren zeigten bei den qRT-PCR-Analysen vergleichbare TI-Effekte, wurden jedoch nicht methyliert. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich beispielsweise stromaufwärts der klonierten Promotorregionen Elemente befinden, die für eine Methylierung durch TI essenziell sind. Bei dem *HBA2*-Promotor könnten beispielsweise die regulatorischen Elemente, die sich zehn bis 50 Kilobasen stromaufwärts der α -Globingene befinden und wichtig für eine Zelltyp-spezifische Expression des Gens sind, eine Rolle bei der Methylierung durch TI spielen.

Des Weiteren könnte im etablierten Zellkulturmodell die Methylierung der Testpromotoren auch deshalb nicht erfolgt sein, weil sich die Flp-In™-T-REx™-293-Zellen deutlich von den Patientenzellen unterscheiden. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den

Flp-In™-T-REx™-293-Zellen um ein Derivat der hypotriploiden HEK293-Zelllinie, welche durch virale Transformation hergestellt wurde. Ähnlich zu transformierten Tumorzellen, könnte das Genom der Flp-In™-T-REx™-293-Zellen hypomethyliert vorliegen und die *de novo* Methylierung in diesen Zellen schlechter funktionieren. Dies lässt die schwache Genexpression der *de novo* Methyltransferase *DNMT3A* in den Flp-In™-T-REx™-293-Zellen vermuten. Das Gen der *de novo* Methyltransferase *DNMT3B* wird in diesen Zellen, im Vergleich zu *DNMT3A*, jedoch stärker exprimiert (Neumann et al. 2012). Eine MLPA-Analyse sollte daher Aufschluss über den Grad der DNA-Methylierung in dieser Zelllinie geben. Da sich der Karyotyp jedoch deutlich von dem normaler menschlicher Zellen unterscheidet, erwies sich die Analyse als schwierig und nicht informativ (Daten sind nicht gezeigt).

Mit einem ähnlichen Zellkulturmodell, welches den *SNRPN*-Promotor beinhaltet, erfolgte eine dreitägige transiente Überexpression der *de novo* Methyltransferase *DNMT3A2*, einer Isoform von *DNMT3A* (Chen et al. 2002). Hierdurch sollte die Etablierung der Methylierung des *SNRPN*-Promotors in der Keimbahn nachempfunden werden. Bei dieser Analyse konnte zwar auch ein TI-Effekt nachgewiesen werden, eine Methylierung des *SNRPN*-Promotors blieb jedoch aus (Masterarbeit N. Utz 2015). Allerdings spielt in der Keimbahn neben der *DNMT3A*-Methyltransferase auch der Kofaktor *DNMT3L* bei der *de novo* DNA-Methylierung eine Rolle, der in der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 nicht exprimiert wird (Kelsey und Feil 2012; Neumann et al. 2012). Bei der bereits beschriebenen Studie von Lynch-Syndrom-Patienten führte TI aber auch in epithelialen Zellen zur *de novo* DNA-Methylierung des *MSH2*-Promotors, obwohl für *DNMT3L* beispielsweise im Darm des Menschen keine Expression nachgewiesen wurde (Hughes et al. 2007; Ligtenberg et al. 2009). Daher wird angenommen, dass *DNMT3L* für die Promotormethylierung im etablierten Zellkulturmodell nicht zwingend erforderlich ist.

Die Etablierung von DNA-Methylierungen ist jedoch ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren, über die bisher nur wenig bekannt ist. Da ebenfalls unklar ist wieviel Zeit differenzierte Zellen für die Etablierung der DNA-Methylierung durch TI benötigen, war das gewählte Zeitfenster möglicherweise zu kurz. Die Methylierungsanalysen wurden nach 24-stündiger und 14-tägiger Induktion der überlappenden Transkription durchgeführt. Bei dem bereits erwähnten transgenen Mausmodell, welches die Situation in den betroffenen Patienten imitierte, erfolgte die Methylierung der *HBA2*-Promotorregion vermutlich während der Welle der *de novo* DNA-Methylierungen, die sich um den Zeitpunkt der Implantation der Oozyte abspielt. Die Methylierung des *HBA2*-Promotors konnte jedoch auch in EBs nachgewiesen werden. Hierfür wurden ES-Zellen der transgenen Mäuse in EBs differenziert und bereits sieben Tage nach Beginn der Differenzierung konnte eine

Methylierung des *HBA2*-Promotors nachgewiesen werden (Tufarelli et al. 2003). Im Gegensatz zu den Flp-InTM-T-RExTM-293-Zellen haben ES-Zellen und EBs jedoch noch ein größeres Entwicklungspotenzial. Die ausdifferenzierten Flp-InTM-T-RExTM-293-Zellen könnten, insbesondere auch wegen des niedrigen *DNMT3A*-Expressionslevels, mehr Zeit für die Methylierung der Testpromotoren benötigen.

5 **Ausblick**

Die Ergebnisse zeigen, dass das etablierte Zellkulturmodell TI zwischen konvergenten und Tandem-Promotoren erfolgreich nachbildet. Durch einen gleichbleibenden Versuchsaufbau konnte bei ähnlich starker Induktion der überlappenden Transkription mit den Promotoren der Gene *HBA2* und *UBE3A* ein unterschiedlich starker TI-Effekt beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Regulation durch TI im etablierten Zellkulturmodell abhängig vom integrierten humanen Promotor erfolgt. Da das etablierte Modell die Integration beliebiger humaner Promotoren ermöglicht, kann hiermit die unterschiedliche Wirkung von TI auf verschiedene Promotoren untersucht werden. Es wurde somit eine Basis für die Analyse Promotor-abhängiger TI-Effekte geschaffen. Das etablierte Zellkulturmodell hat daher das Potenzial einen tieferen Einblick in die Regulation durch TI zu gewähren.

Aus diesem Grund soll in weiteren Experimenten zunächst der TI-Mechanismus bestimmt werden, welcher in den etablierten Zelllinien vorherrscht. Durch strangspezifische qRT-PCR-Analysen soll in den *Antisense*-Zelllinien die Transkription entlang des *EGFP*-Gens mithilfe von verschiedenen *Primern* und Sonden analysiert werden. Falls auf diese Weise entlang des *EGFP*-Gens ein ähnliches Transkriptlevel nachgewiesen werden kann, so handelt es sich dabei vermutlich um einen TI-Mechanismus der direkt am Promotor erfolgt. Nimmt die *EGFP*-Transkription jedoch zum 3'-Ende des *EGFP*-Gens ab, so findet wahrscheinlich eine Kollision der RNA-Polymerasen von Exon_2/3 und *EGFP* entlang des *EGFP*-Gens statt.

Bei Patientenstudien konnte durch eine mit den Genen *HBA2* und *MSH2* stattfindende überlappende Transkription die Methylierung des jeweiligen Promotors beobachtet werden (Tufarelli et al. 2003; Ligtenberg et al. 2009). Im etablierten Zellkulturmodell konnte jedoch keine Methylierung der Testpromotoren nachgewiesen werden. Ob dies durch eine unzureichende Expression der *de novo* DNA-Methyltransferase *DNMT3A* in den Flp-In™-T-REx™-293-Zellen hervorgerufen wird, soll in einem auf dieser Arbeit aufbauenden Zellkulturmodell durch eine stabile Überexpression von *DNMT3A* untersucht werden. Hierdurch könnte das Zellkulturmodell auch für Untersuchungen, die sich mit der Etablierung der genomischen Prägung beschäftigen, nutzbar gemacht werden. Da dieser Prozess bereits in der Keimbahn erfolgt und humane Oozyten nur eingeschränkt zur Verfügung stehen, könnte das Zellkulturmodell für diese Untersuchungen eine wertvolle Alternative bieten.

6 Zusammenfassung

Als transkriptionelle Interferenz (TI) wird die direkte Unterdrückung eines Transkriptionsprozesses durch einen anderen *in cis* bezeichnet. TI ist ein weit verbreiteter Mechanismus zur Transkriptionsregulation, der durch Transkription von konvergenten, divergierenden oder im Tandem angeordneten Promotoren hervorgerufen werden kann. Bei Säugetieren ist die TI auch an der Regulation der Expression von Genen beteiligt, die der genomischen Prägung unterliegen. In Neuronen der Maus und des Menschen wird das geprägte Gen *Ube3a* ausschließlich vom maternal ererbten Allel exprimiert. Auf dem paternalen Allel überlappt die Transkription der langen nicht-kodierenden RNA *Snhg14* mit dem *Ube3a*-Gen und führt durch TI zur monoallelischen *Ube3a*-Expression.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Etablierung eines Zellkulturmodells, welches die Untersuchung von TI mit beliebigen humanen Promotoren erlaubt. Hierfür wurden die Promotoren der Gene *UBE3A*, *HBA2* und *MSH2* als Testpromotoren ausgewählt und ihre Aktivität zunächst mittels Luciferaseaktivitätsmessungen in humanen, transient transfizierten Flp-In™-T-REx™-293-Zellen bestimmt. Für die Etablierung des Zellkulturmodells wurden die Testpromotoren zusammen mit dem *EGFP*-Gen stromabwärts eines induzierbaren *CMV*-Promotors integriert, welcher die Expression des überlappenden β -Globin-Transkripts Exon_2/3 steuert. Die Testpromotoren *UBE3A* und *HBA2* wurden dabei in konvergenter Richtung zum *CMV*-Promotor inseriert, während der *MSH2*-Promotor in Tandem-Orientierung positioniert wurde. Durch die Zugabe von Doxycyclin für drei, sieben, zehn und 14 Tage wurde der *CMV*-Promotor in der jeweiligen stabilen Flp-In™-T-REx™-293-Zelllinie induziert und die Auswirkungen auf die Exon_2/3- und *EGFP*-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Dabei zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien und zu allen Zeitpunkten eine Zunahme der Exon_2/3-Expression, da dieses Transkript durch den mit Doxycyclin induzierbaren *CMV*-Promotor gesteuert wird. Die *EGFP*-Expression, welche in dem etablierten Zellkulturmodell durch den jeweiligen Testpromotor kontrolliert wird, war in diesen Zellen hingegen reduziert. Die Reduktion der *EGFP*-Expression erfolgte durch TI und konnte auch durch eine Abnahme der EGFP-Fluoreszenz mittels Mikroskopie beobachtet werden. Der stärkste TI-Effekt wurde mit dem integrierten *UBE3A*-Testpromotor bestimmt, gefolgt von den Promotoren von *HBA2* und *MSH2*. Die Ergebnisse zeigen, dass sich das etablierte Zellkulturmodell für die Untersuchung von TI eignet und die Stärke des beobachteten TI-Effekts abhängig vom integrierten Promotor ist. Zudem ergaben weitere Untersuchungen, dass der TI-Effekt im etablierten Modell reversibel ist und keine Methylierung der Testpromotoren hervorgerufen wurde.

7 Literaturverzeichnis

- Adams DJ, Quail MA, Cox T, van der Weyden L, Gorick BD, Su Q, Chan W, Davies R, Bonfield JK, Law F, et al. (2005): A genome-wide, end-sequenced 129Sv BAC library resource for targeting vector construction. *Genomics* 86, 753–758
- Adelman K, Lis JT (2012): Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nature Reviews Genetics* 13, 720–731
- Adhya S, Gottesman M (1982): Promoter occlusion: transcription through a promoter may inhibit its activity. *Cell* 29, 939–944
- Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaudet AL (1997): Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* 17, 75–78
- Barbour VM, Tufarelli C, Sharpe JA, Smith ZE, Ayyub H, Heinlein CA, Sloane-Stanley J, Indrak K, Wood WG, Higgs DR (2000): alpha-thalassemia resulting from a negative chromosomal position effect. *Blood* 96, 800–807
- Barlow DP, Bartolomei MS (2014): Genomic Imprinting in Mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, a018382–a018382
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007): High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* 129, 823–837
- Bartolomei MS, Ferguson-Smith AC (2011): Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3
- Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, Vitale L, Pelleri MC, Tassani S, Piva F, et al. (2013): An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol* 40, 463–471
- Bird AP (1980): DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 1499–1504
- Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Stamatoyannopoulos JA, et al. (2007): Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799–816
- Blackledge NP, Klose R (2011): CpG island chromatin: A platform for gene regulation. *Epigenetics* 6, 147–152
- Bordoy AE, Chatterjee A (2015): Cis-Antisense Transcription Gives Rise to Tunable Genetic Switch Behavior: A Mathematical Modeling Approach. *PLOS ONE* 10, e0133873
- Buiting K (2010): Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C, 365–376
- Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Färber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Bürger J, Nöthen MM, et al. (1998): Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 63, 170–180

- Buiting K, Lich C, Cottrell S, Barnicoat A, Horsthemke B (1999): A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum Genet* 105, 665–666
- Buiting K, Gross S, Lich C, Gillessen-Kaesbach G, el-Maarri O, Horsthemke B (2003): Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* 72, 571–577
- Callen BP, Shearwin KE, Egan JB (2004): Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter. *Mol Cell* 14, 647–656
- Chamberlain SJ, Brannan CI (2001): The Prader-Willi syndrome imprinting center activates the paternally expressed murine Ube3a antisense transcript but represses paternal Ube3a. *Genomics* 73, 316–322
- Chamberlain SJ, Lalande M (2010): Angelman Syndrome, a Genomic Imprinting Disorder of the Brain. *Journal of Neuroscience* 30, 9958–9963
- Chen T, Ueda Y, Xie S, Li E (2002): A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem* 277, 38746–38754
- Chester N, Marshak DR (1993): Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 209, 284–290
- Choi OR, Engel JD (1988): Developmental regulation of beta-globin gene switching. *Cell* 55, 17–26
- Chotalia M, Smallwood SA, Ruf N, Dawson C, Lucifero D, Frontera M, James K, Dean W, Kelsey G (2009): Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes & Development* 23, 105–117
- Cowling VH (2010): Regulation of mRNA cap methylation. *Biochemical Journal* 425, 295–302
- Cramer P, Armache K-J, Baumli S, Benkert S, Brueckner F, Buchen C, Damsma GE, Dengl S, Geiger SR, Jasiak AJ, et al. (2008): Structure of Eukaryotic RNA Polymerases. *Annual Review of Biophysics* 37, 337–352
- Crampton N, Bonass WA, Kirkham J, Rivetti C, Thomson NH (2006): Collision events between RNA polymerases in convergent transcription studied by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* 34, 5416–5425
- Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, et al. (2010): Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 21931–21936
- Dagli A, Buiting K, Williams CA (2012): Molecular and Clinical Aspects of Angelman Syndrome. *Mol Syndromol* 2, 100–112
- Darzacq X, Shav-Tal Y, de Turris V, Brody Y, Shenoy SM, Phair RD, Singer RH (2007): In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 796–806

- Deaton AM, Bird A (2011): CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development* 25, 1010–1022
- Dieci G, Sentenac A (2003): Detours and shortcuts to transcription reinitiation. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 202–209
- Dindot SV, Person R, Strivens M, Garcia R, Beaudet AL (2009): Epigenetic profiling at mouse imprinted gene clusters reveals novel epigenetic and genetic features at differentially methylated regions. *Genome Res* 19, 1374–1383
- Dittrich B, Buiting K, Korn B, Rickard S, Buxton J, Saitoh S, Nicholls RD, Poustka A, Winterpacht A, Zabel B, Horsthemke B (1996): Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. *Nat Genet* 14, 163–170
- Dodd IB, Egan JB (2002): Action at a distance in CI repressor regulation of the bacteriophage 186 genetic switch. *Mol Microbiol* 45, 697–710
- Engelberg-Kulka H, Kumar S (2015): Yet another way that phage λ manipulates its *Escherichia coli* host: λ *rexB* is involved in the lysogenic-lytic switch: λ *rexB* insures phage λ lysogenic-lytic switch. *Molecular Microbiology* 96, 689–693
- Epshtein V, Toulmé F, Rahmouni AR, Borukhov S, Nudler E (2003): Transcription through the roadblocks: the role of RNA polymerase cooperation. *EMBO J* 22, 4719–4727
- Gentile JK, Tan W-H, Horowitz LT, Bacino CA, Skinner SA, Barbieri-Welge R, Bauer-Carlin A, Beaudet AL, Bichell TJ, Lee H-S, et al. (2010): A neurodevelopmental survey of Angelman syndrome with genotype-phenotype correlations. *J Dev Behav Pediatr* 31, 592–601
- Godiska R, Mead D, Dhodda V, Wu C, Hochstein R, Karsi A, Usdin K, Entezam A, Ravin N (2010): Linear plasmid vector for cloning of repetitive or unstable sequences in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 38, e88–e88
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59–74
- Greally JM, Gray TA, Gabriel JM, Song L, Zemel S, Nicholls RD (1999): Conserved characteristics of heterochromatin-forming DNA at the 15q11-q13 imprinting center. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14430–14435
- Grummt I (1999): Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62, 109–154
- Grünberg S, Hahn S (2013): Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. *Trends in Biochemical Sciences* 38, 603–611
- Hao N, Krishna S, Ahlgren-Berg A, Cutts EE, Shearwin KE, Dodd IB (2014): Road rules for traffic on DNA--systematic analysis of transcriptional roadblocking in vivo. *Nucleic Acids Research* 42, 8861–8872
- Henckel A, Chebli K, Kota SK, Arnaud P, Feil R (2012): Transcription and histone methylation changes correlate with imprint acquisition in male germ cells. *EMBO J* 31, 606–615
- Higgs DR (1993): alpha-Thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol* 6, 117–150

- Hobson DJ, Wei W, Steinmetz LM, Svejstrup JQ (2012): RNA polymerase II collision interrupts convergent transcription. *Mol Cell* 48, 365–374
- Horsthemke B (2010): Mechanisms of imprint dysregulation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C, 321–328
- Horsthemke B, Wagstaff J (2008): Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet A* 146A, 2041–2052
- Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C (2007): The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *BioTechniques* 43, 575–586
- Human Genome Sequencing Consortium I (2004): Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931–945
- Ideraabdullah FY, Vigneau S, Bartolomei MS (2008): Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutat Res* 647, 77–85
- Jagura-Burdzy G, Thomas CM (1997): Dissection of the switch between genes for replication and transfer of promiscuous plasmid RK2: basis of the dominance of trfAp over trbAp and specificity for KorA in controlling the switch. *J Mol Biol* 265, 507–518
- Johnson KA, Lerner CP, Di Lacio LC, Laird PW, Sharpe AH, Simpson EM (1995): Transgenic mice for the preparation of hygromycin-resistant primary embryonic fibroblast feeder layers for embryonic stem cell selections. *Nucleic Acids Res* 23, 1273–1275
- Jonkers I, Lis JT (2015): Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 167–177
- Juven-Gershon T, Kadonaga JT (2010): Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology* 339, 225–229
- Juven-Gershon T, Hsu J-Y, Theisen JW, Kadonaga JT (2008): The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 20, 253–259
- Kelsey G, Feil R (2012): New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368, 20110336–20110336
- Kimura M, Yamaguchi I (1998): Convergent transcription units and their promoters at both ends of pot2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus. *J Biochem* 124, 268–273
- Kishino T, Lalande M, Wagstaff J (1997): UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* 15, 70–73
- van der Klift H, Wijnen J, Wagner A, Verkuilen P, Tops C, Otway R, Kohonen-Corish M, Vasen H, Oliani C, Barana D, et al. (2005): Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 44, 123–138
- Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM, Lalande M, Latt SA (1989): Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* 32, 285–290

- Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S, Olah E (2009): Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 30, 197–203
- Kuiper RP, Vissers LELM, Venkatachalam R, Bodmer D, Hoenselaar E, Goossens M, Haufe A, Kamping E, Niessen RC, Hogervorst FBL, et al. (2011): Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome. *Hum Mutat* 32, 407–414
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921
- Landers M, Bancescu DL, Le Meur E, Rougeulle C, Glatt-Deeley H, Brannan C, Muscatelli F, Lalande M (2004): Regulation of the large (approximately 1000 kb) imprinted murine Ube3a antisense transcript by alternative exons upstream of Snurf/Snrpn. *Nucleic Acids Res* 32, 3480–3492
- Landick R (2006): The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing. *Biochemical Society Transactions* 34, 1062–1066
- Latos PA, Pauler FM, Koerner MV, Şenergin HB, Hudson QJ, Stocsits RR, Allhoff W, Stricker SH, Klement RM, Warczok KE, et al. (2012): Airn transcriptional overlap, but not its lncRNA products, induces imprinted Igf2r silencing. *Science* 338, 1469–1472
- Lavorgna G, Dahary D, Lehner B, Sorek R, Sanderson CM, Casari G (2004): In search of antisense. *Trends Biochem Sci* 29, 88–94
- Lee TI, Young RA (2000): Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34, 77–137
- Lewis MW, Brant JO, Kramer JM, Moss JI, Yang TP, Hansen PJ, Williams RS, Resnick JL (2015): Angelman syndrome imprinting center encodes a transcriptional promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 6871–6875
- Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TYH, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJB, et al. (2009): Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 41, 112–117
- Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Geurts van Kessel A, Hoogerbrugge N (2013): EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients. *Fam Cancer* 12, 169–174
- Li L-C, Dahiya R (2002): MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18, 1427–1431
- Lucas B, Grigo K, Erdmann S, Lausen J, Klein-Hitpass L, Ryffel GU (2005): HNF4alpha reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma. *Oncogene* 24, 6418–6431
- Lwoff A (1953): Lysogeny. *Bacteriol Rev* 17, 269–337
- Lynch HT, de la Chapelle A (2003): Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348, 919–932
- Malcolm S, Clayton-Smith J, Nichols M, Robb S, Webb T, Armour JA, Jeffreys AJ, Pembrey ME (1991): Uniparental paternal disomy in Angelman's syndrome. *Lancet* 337, 694–697

- Margolis SS, Sell GL, Zbinden MA, Bird LM (2015): Angelman Syndrome. *Neurotherapeutics* 12, 641–650
- Martens JA, Laprade L, Winston F (2004): Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* SER3 gene. *Nature* 429, 571–574
- Martinez-Noel G, Galligan JT, Sowa ME, Arndt V, Overton TM, Harper JW, Howley PM (2012): Identification and Proteomic Analysis of Distinct UBE3A/E6AP Protein Complexes. *Molecular and Cellular Biology* 32, 3095–3106
- Martins-Taylor K, Hsiao JS, Chen P-F, Glatt-Deeley H, De Smith AJ, Blakemore AIF, Lalande M, Chamberlain SJ (2014): Imprinted expression of UBE3A in non-neuronal cells from a Prader-Willi syndrome patient with an atypical deletion. *Human Molecular Genetics* 23, 2364–2373
- Maston GA, Evans SK, Green MR (2006): Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 29–59
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL (1997): De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet* 15, 74–77
- Mazo A, Hodgson JW, Petruk S, Sedkov Y, Brock HW (2007): Transcriptional interference: an unexpected layer of complexity in gene regulation. *Journal of Cell Science* 120, 2755–2761
- Meng L, Person RE, Beaudet AL (2012): Ube3a-ATS is an atypical RNA polymerase II transcript that represses the paternal expression of Ube3a. *Human Molecular Genetics* 21, 3001–3012
- Meng L, Person RE, Huang W, Zhu PJ, Costa-Mattioli M, Beaudet AL (2013): Truncation of Ube3a-ATS Unsilences Paternal Ube3a and Ameliorates Behavioral Defects in the Angelman Syndrome Mouse Model. *PLoS Genetics* 9, e1004039
- Merkhofer EC, Hu P, Johnson TL (2014): Introduction to cotranscriptional RNA splicing. *Methods Mol Biol* 1126, 83–96
- Nag A, Narsinh K, Martinson HG (2007): The poly(A)-dependent transcriptional pause is mediated by CPSF acting on the body of the polymerase. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 662–669
- Nasser W, Rochman M, Muskhelishvili G (2002): Transcriptional regulation of fis operon involves a module of multiple coupled promoters. *EMBO J* 21, 715–724
- Neumann LC, Markaki Y, Mladenov E, Hoffmann D, Buiting K, Horsthemke B (2012): The imprinted NPAP1/C15orf2 gene in the Prader-Willi syndrome region encodes a nuclear pore complex associated protein. *Hum Mol Genet* 21, 4038–4048
- Nicholls RD, Knepper JL (2001): Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2, 153–175
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006): Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1, 1559–1582

- Numata K, Kohama C, Abe K, Kiyosawa H (2011): Highly parallel SNP genotyping reveals high-resolution landscape of mono-allelic Ube3a expression associated with locus-wide antisense transcription. *Nucleic Acids Research* 39, 2649–2657
- Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, et al. (1999a): Imprinting-Mutation Mechanisms in Prader-Willi Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 64, 397–413
- Ohta T, Buiting K, Kokkonen H, McCandless S, Heeger S, Leisti H, Driscoll DJ, Cassidy SB, Horsthemke B, Nicholls RD (1999b): Molecular Mechanism of Angelman Syndrome in Two Large Families Involves an Imprinting Mutation. *The American Journal of Human Genetics* 64, 385–396
- Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, Nikaido I, Osato N, Saito R, Suzuki H, et al. (2002): Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* 420, 563–573
- Osato N, Suzuki Y, Ikeo K, Gojobori T (2007): Transcriptional interferences in cis natural antisense transcripts of humans and mice. *Genetics* 176, 1299–1306
- Palmer AC, Ahlgren-Berg A, Egan JB, Dodd IB, Shearwin KE (2009): Potent transcriptional interference by pausing of RNA polymerases over a downstream promoter. *Mol Cell* 34, 545–555
- Palmer AC, Egan JB, Shearwin KE (2011): Transcriptional interference by RNA polymerase pausing and dislodgement of transcription factors. *Transcription* 2, 9–14
- Pittard J (1996): The various strategies within the TyrR regulon of Escherichia coli to modulate gene expression. *Genes to Cells* 1, 717–725
- Portin P (2002): Historical Development of the Concept of the Gene. *The Journal of Medicine and Philosophy* 27, 257–286
- Prescott EM, Proudfoot NJ (2002): Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8796–8801
- Price AL, Eskin E, Pevzner PA (2004): Whole-genome analysis of Alu repeat elements reveals complex evolutionary history. *Genome Res* 14, 2245–2252
- Proudfoot NJ (2011): Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes & Development* 25, 1770–1782
- Quinn JJ, Chang HY (2015): Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature Reviews Genetics* 17, 47–62
- Rahmann S, Beygo J, Kanber D, Martin M, Horsthemke B, Buiting K (2013): Amplifyer: Automated methylation analysis of amplicons from bisulfite flowgram sequencing.
- Reik W, Walter J (2001): Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2, 21–32
- Ribeiro DM, Sonati MF (2008): Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. *Genet Mol Res* 7, 1045–1053
- Roeder RG, Rutter WJ (1969): Multiple Forms of DNA-dependent RNA Polymerase in Eukaryotic Organisms. *Nature* 224, 234–237

- Rougeulle C, Glatt H, Lalande M (1997): The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/IE6-AP, is imprinted in brain. *Nature Genetics* 17, 14–15
- Runte M, Hüttenhofer A, Gross S, Kiefmann M, Horsthemke B, Buiting K (2001): The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet* 10, 2687–2700
- Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G, Varon R, Horn D, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K (2004): SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum Genet* 114, 553–561
- Saeki H, Svejstrup JQ (2009): Stability, flexibility, and dynamic interactions of colliding RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell* 35, 191–205
- Sainsbury S, Bernecky C, Cramer P (2015): Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 129–143
- Saunders A, Core LJ, Lis JT (2006): Breaking barriers to transcription elongation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 557–567
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL (2006): A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 1412–1417
- Schechter AN (2008): Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 112, 3927–3938
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505
- Shandilya J, Roberts SGE (2012): The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim Biophys Acta* 1819, 391–400
- Shearwin K, Callen B, Egan J (2005): Transcriptional interference – a crash course. *Trends in Genetics* 21, 339–345
- Shlyueva D, Stampfel G, Stark A (2014): Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat Rev Genet* 15, 272–286
- Simons RW, Hoopes BC, McClure WR, Kleckner N (1983): Three promoters near the termini of IS10: pIN, pOUT, and pIII. *Cell* 34, 673–682
- Sleutels F, Zwart R, Barlow DP (2002): The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 415, 810–813
- Smale ST, Kadonaga JT (2003): The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449–479
- Smith EY, Futtner CR, Chamberlain SJ, Johnstone KA, Resnick JL (2011): Transcription is required to establish maternal imprinting at the Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome locus. *PLoS Genet* 7, e1002422
- Sneppen K, Dodd IB, Shearwin KE, Palmer AC, Schubert RA, Callen BP, Egan JB (2005): A mathematical model for transcriptional interference by RNA polymerase traffic in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 346, 399–409

- Soriano P (1999): Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70–71
- Stolc V, Gauhar Z, Mason C, Halasz G, van Batenburg MF, Rifkin SA, Hua S, Herreman T, Tongprasit W, Barbano PE, et al. (2004): A gene expression map for the euchromatic genome of *Drosophila melanogaster*. *Science* 306, 655–660
- Sultan M, Amstislavskiy V, Risch T, Schuette M, Dökel S, Ralser M, Balzereit D, Lehrach H, Yaspo M-L (2014): Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data. *BMC Genomics* 15, 675
- Takai D, Jones PA (2002): Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 3740–3745
- Tan W-H, Bacino CA, Skinner SA, Anselm I, Barbieri-Welge R, Bauer-Carlin A, Beaudet AL, Bichell TJ, Gentile JK, Glaze DG, et al. (2011): Angelman syndrome: Mutations influence features in early childhood. *Am J Med Genet A* 155A, 81–90
- Tudek A, Candelli T, Libri D (2015): Non-coding transcription by RNA polymerase II in yeast: Hasard or nécessité? *Biochimie* 117, 28–36
- Tufarelli C, Stanley JAS, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG, Higgs DR (2003): Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet* 34, 157–165
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, et al. (2015): Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419–1260419
- Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM (2009): A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nature Reviews Genetics* 10, 252–263
- Vermeulen J, De Preter K, Lefever S, Nuytens J, De Vloed F, Derveaux S, Hellemans J, Speleman F, Vandesompele J (2011): Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 39, e63
- Vernimmen D, Marques-Kranc F, Sharpe JA, Sloane-Stanley JA, Wood WG, Wallace HAC, Smith AJH, Higgs DR (2009): Chromosome looping at the human alpha-globin locus is mediated via the major upstream regulatory element (HS -40). *Blood* 114, 4253–4260
- Vu TH, Hoffman AR (1997): Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. *Nat Genet* 17, 12–13
- Wang P, Yang J, Pittard AJ (1997): Promoters and transcripts associated with the aroP gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 4206–4212
- Wang P, Yang J, Ishihama A, Pittard AJ (1998): Demonstration that the TyrR protein and RNA polymerase complex formed at the divergent P3 promoter inhibits binding of RNA polymerase to the major promoter, P1, of the aroP gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180, 5466–5472
- Wawrzik M, Spiess A-N, Herrmann R, Buiting K, Horsthemke B (2009): Expression of SNURF-SNRPN upstream transcripts and epigenetic regulatory genes during human spermatogenesis. *Eur J Hum Genet* 17, 1463–1470

- Werdien D, Peiler G, Ryffel GU (2001): FLP and Cre recombinase function in *Xenopus* embryos. *Nucleic Acids Res* 29, E53–53
- Whipp MJ, Pittard AJ (1977): Regulation of aromatic amino acid transport systems in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 132, 453–461
- White RJ (2011): Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nature Reviews Genetics* 12, 459–463
- Williams CA, Beaudet AL, Clayton-Smith J, Knoll JH, Kyllerman M, Laan LA, Magenis RE, Moncla A, Schinzel AA, Summers JA, Wagstaff J (2006): Angelman syndrome 2005: updated consensus for diagnostic criteria. *Am J Med Genet A* 140, 413–418
- Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL (2009): Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes & Development* 23, 1494–1504
- Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JHJM, Litvinov SV (2003): The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 163, 2139–2148
- Xie W, Barr CL, Kim A, Yue F, Lee AY, Eubanks J, Dempster EL, Ren B (2012): Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome. *Cell* 148, 816–831
- Yamada K, Lim J, Dale JM, Chen H, Shinn P, Palm CJ, Southwick AM, Wu HC, Kim C, Nguyen M, et al. (2003): Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome. *Science* 302, 842–846
- Yamamoto Y, Huibregtse JM, Howley PM (1997): The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing. *Genomics* 41, 263–266
- Yelin R, Dahary D, Sorek R, Levanon EY, Goldstein O, Shoshan A, Diber A, Biton S, Tamir Y, Khosravi R, et al. (2003): Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nat Biotechnol* 21, 379–386
- Ying Q-L, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A (2003): Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 21, 183–186

8 Anhang

8.1 Oligonukleotide

8.1.1 Oligonukleotide für den Transkriptabbruch der lncRNA *Snhg14*

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Oligonukleotide wurden zur Vervielfältigung der murinen *Ube3a*-Intron1-Homologiesequenz von genomischer DNA und der Stoppkassette von pBS_tkneo511_BGfrt verwendet (Tabelle 4). Um die DNA-Fragmente später in einen Expressionsvektor inserieren zu können, wurden *Primer* verwendet, die an ihrem 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle aufweisen.

Zudem sind in den nachfolgenden Tabellen die *Primer* für Sequenzierungen (Tabelle 5 und Tabelle 6) und die Durchführung des Gibson *Assembly* (Tabelle 7) angegeben.

Tabelle 4: *Primer* zur Vervielfältigung der murinen *Ube3a*-Intron1-Homologiesequenz von genomischer DNA und der Stoppkassette von pBS_tkneo511_BGfrt. Die *Primer* weisen eine Restriktionsschnittstelle auf, deren Sequenz grau hinterlegt ist.

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
<i>Ube3a_int1_F</i>	TGCTTCGGATCCACCTGCTTCAGCTAAGAC	Vervielfältigung der murinen <i>Ube3a</i> -Intron1-Homologiesequenz
<i>Ube3a_int1_R</i>	CTCAGGGATCCCCCACAATCCAACACTATC	Vervielfältigung der murinen <i>Ube3a</i> -Intron1-Homologiesequenz
<i>Ube3a_int1_F2</i>	CAATGTGGATCCTCCTAAAAATTACACTTG	Vervielfältigung der murinen <i>Ube3a</i> -Intron1-Homologiesequenz
<i>Ube3a_int1_R2</i>	CAAAGAGGATCCATGTCCATTTCTTTAT	Vervielfältigung der murinen <i>Ube3a</i> -Intron1-Homologiesequenz
<i>Ube3a_int1_F3</i>	CCATTGTGGAACCATGGCCATAATTA	Vervielfältigung der murinen <i>Ube3a</i> -Intron1-Homologiesequenz
<i>Ube3a_int1_R3</i>	TAATTATGGCCATGGTTCCACAATGG	Vervielfältigung der murinen <i>Ube3a</i> -Intron1-Homologiesequenz
<i>Ube3a_int1_F4</i>	GTGTTTCTGAGGATCCTTTGAATTGTG	Vervielfältigung der murinen <i>Ube3a</i> -Intron1-Homologiesequenz
rBG_ <i>PacI</i> _F	GACTCATTAATTAACGAATTGGAGCTCCACCG	Vervielfältigung der Exon_2/3-Sequenz
rBG_ <i>PacI</i> _Sall_R	TGGCGCTTAATTAAGTCGACAACCTGACTACGGACCGG	Vervielfältigung der Exon_2/3-Sequenz
neo_ <i>Sall</i> _F	ACACTGGTCGACGGATCCGAACAAACG	Vervielfältigung der Neomycin-Resistenzsequenz
neo_ <i>Sall</i> _R	CTCGAGGTCGACGAATTCGGATCATATTCAAT	Vervielfältigung der Neomycin-Resistenzsequenz

Tabelle 5: Primer für die Sequenzierung der *Ube3a*-Intron1-Homologiefragmente.

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
T7 promoter	AATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung der <i>Ube3a</i> -Intron1-Homologiefragmente in pBS II KS(+), pCR™2.1 und pCR™-Blunt II-TOPO®
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung der <i>Ube3a</i> -Intron1-Homologiefragmente in pBS II KS(+), pCR™2.1 und pCR™-Blunt II-TOPO®
<i>Ube3a</i> _int1_F5	GTCTTACTTGCAGCCCATCA	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-3kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F6	CAACCATGAAAGGCTTGAAA	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-3kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F7	GGAGCAGGCCATTTATCTTTC	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-3kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F8	TTGCAAAGCTGAATTCCTTGT	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-3kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F9	GCAGCAGCTCAGTACATTTACG	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-3kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F10	CCCTTGAATTCCTGGTCTTCG	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-3kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F11	CTGTAGACCAGGGAGACCTCA	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-3kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F12	AGTGCACTCCTAAGGGGAAGT	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-4kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F13	CTCCGCTTGGAATTTCTGTC	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-4kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F14	CACAGGGAAGAGGTGAACGTA	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-4kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F15	TGGCCTGGACAATTAACAAAG	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-4kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F16	TGGCTTTATCCTACTCATGGAGAT	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-4kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F17	CTTGCCATCAGTTTATGTGTCTT	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-4kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F18	AATGGCATCTTTTGTGTTTGC	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-4kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F19	AGGTGTGAGTTGTCTGGGAAA	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-4kb-PCR-Homologiefragments
<i>Ube3a</i> _int1_F20	TTTGGATTACTGGATGTGACCA	Sequenzierung des <i>Ube3a</i> -Intron1-4kb-PCR-Homologiefragments

Tabelle 6: Primer für die Sequenzierung der pBS-*Ube3a*_int1_6kb-Konstrukte.

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
<i>Ube3a</i> _int1_F8	TTGCAAAGCTGAATTCCTTGT	Sequenzierung der Exon_2/3-Sequenz in pBS- <i>Ube3a</i> _int1_6kb
b-globin_ex3_R	TGAGACAGCACACAACCAG	Sequenzierung der Exon_2/3-Sequenz in pBS- <i>Ube3a</i> _int1_6kb
b-globin_ex3_F	CTGGTTGTTGTGCTGTCTCA	Sequenzierung der Exon_2/3-Sequenz in pBS- <i>Ube3a</i> _int1_6kb
neo_seq_F	TCTCCTAGAGTTAACACTGG	Sequenzierung der Neomycin-Resistenzsequenz in pBS- <i>Ube3a</i> _int1_6kb
<i>Ube3a</i> _int1_R6	GCTTAACTATGGTACTATGGC	Sequenzierung der Exon_2/3-Sequenz bzw. Neomycin-Resistenzsequenz in pBS- <i>Ube3a</i> _int1_6kb

Tabelle 7: Primer für die Insertion der Stoppkassette in pBS-*Ube3a*_int1_6kb mittels Gibson Assembly.

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
<i>Ube3a</i> -neo_F	GGCCATTTATCTTTCTAAGGAATTAACCCTCACTAAAG GG	Vervielfältigung der Stoppkassette für die Insertion in pBS- <i>Ube3a</i> _int1_6kb mittels Gibson Assembly
<i>Ube3a</i> -rBG_R	CCACTTTAATATGATTAACAAGGCGAATTGGAGCTCCA CCG	Vervielfältigung der Stoppkassette für die Insertion in pBS- <i>Ube3a</i> _int1_6kb mittels Gibson Assembly
neo-rBG_R	GTCAGGTTGCTGCAGGAATTCGATGAT	Vervielfältigung der Stoppkassette für die Insertion in pBS- <i>Ube3a</i> _int1_6kb mittels Gibson Assembly
rBG-neo_F	CCTGCAGCAACCTGACTACGGACCGG	Vervielfältigung der Stoppkassette für die Insertion in pBS- <i>Ube3a</i> _int1_6kb mittels Gibson Assembly

8.1.2 Oligonukleotide für die Etablierung des Zellkulturmodells

Die Vervielfältigung der Promotorregionen *UBE3A*, *HBA2* und *MSH2* von genomischer DNA erfolgte mithilfe von *Primern*, welche eine Restriktionsschnittstelle an ihrem 5'-Ende aufweisen (Tabelle 8).

Zusätzlich dazu sind in den nachfolgenden Tabellen die für die Sequenzierungen (Tabelle 9), den Klonierungslinker (Tabelle 10), die ortsspezifische Mutagenese (Tabelle 10), die qRT-PCR-Analysen (Tabelle 11) und die Methylierungsanalysen (Tabelle 12) verwendeten *Primer* aufgeführt.

Tabelle 8: *Primer* zur Vervielfältigung der genomischen DNA im putativen Promotorbereich. Die *Primer* weisen Restriktionsschnittstellen (grau) auf.

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
<i>UBE3A_promoter_XhoI_F1</i>	GCTCGAGGGTGACCCTGGTACCAAATA	Vervielfältigung der <i>UBE3A</i> -Promotorsequenz
<i>UBE3A_promoter_BamHI_R1</i>	CGGATCCAGAGGTGAAGCGTAAGTAGG	Vervielfältigung der <i>UBE3A</i> -Promotorsequenz
<i>HBA2_prom_XhoI_F3</i>	TTTTTGCTCGAGTAGTAGAGACGGGGTTTCTC	Vervielfältigung der <i>HBA2</i> -Promotorsequenz
<i>HBA2_prom_BamHI_R3</i>	AGACAGGGATCCGGTGGGTTCTCTGAGT	Vervielfältigung der <i>HBA2-short</i> -Promotorsequenz
<i>HBA2_prom_BamHI_R4</i>	CAGCAGGGATCCGCTTAGGAGCTGTGCAGA	Vervielfältigung der <i>HBA2-long</i> -Promotorsequenz
<i>MSH2_promoter_XhoI_F1</i>	GCTCGAGGGGACATAGCAGGCCATATA	Vervielfältigung der <i>MSH2</i> -Promotorsequenz
<i>MSH2_promoter_BamHI_R1</i>	CGGATCCCATGTACTTGATCACCCC	Vervielfältigung der <i>MSH2</i> -Promotorsequenz

Tabelle 9: Primer für die Sequenzierung der Minigene.

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
T7 promoter	AATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung der pCR™2.1-Promotor-, pCR™-Blunt II-TOPO®-Promotor- bzw. pBS-Ex2/3-Konstrukte
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung der pCR™2.1-Promotor-, pCR™-Blunt II-TOPO®-Promotor- bzw. pBS-Ex2/3-Konstrukte
HBA2_promoter_F2	AGTGGGAGAGTCAGTCACAC	Sequenzierung der <i>HBA2-short</i> - bzw. <i>HBA2-long</i> -Promotorsequenz
luc2_seq_F	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	Sequenzierung der pGL4.10-Promotor-Konstrukte
luc2_seq_R	CGTCTTCGAGTGGGTAGAAT	Sequenzierung der pGL4.10-Promotor-Konstrukte
pEGFP-N1_rev	GTCCAGCTCGACCAGGATGGG	Sequenzierung der pEGFP_N3-Promotor-Konstrukte
pEGFP-CMV-Prom	GCGGTAGGCGTGTACGGTGG	Sequenzierung der pEGFP_N3-Promotor-Konstrukte
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	Sequenzierung der Ex2/3-linker-Sequenz und Promotor-EGFP-Sequenzen in pcDNA5/FRT/TO-Ex2/3
BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Sequenzierung der Ex2/3-linker-Sequenz in pcDNA5/FRT/TO-Ex2/3
b-globin_ex3_R	TGAGACAGCACAAACAACCAG	Sequenzierung der Orientierung des Klonierungslinkers bzw. der Promotor-EGFP-Sequenzen in pcDNA5/FRT/TO-Ex2/3

Für den Klonierungslinker wurden Oligonukleotide mit Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI, *Eco*RV, *Kpn*I und *Sma*I verwendet. Die ortsspezifische Mutagenese erfolgte mithilfe von Oligonukleotiden, welche einen Basenaustausch in der Sequenz des *MSH2*-Promotors herbeiführten.

Tabelle 10: Oligonukleotide für den Klonierungslinker und die ortsspezifische Mutagenese. Die Oligonukleotide für den Klonierungslinker weisen Restriktionsschnittstellen (grau) auf. Bei der ortsspezifischen Mutagenese führt ein Basenaustausch in der Sequenz der Oligonukleotide zu einem entsprechenden Basenaustausch in der Sequenz des *MSH2*-Promotors (unterstrichen dargestellt).

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
<i>Bam</i> HI_ <i>Eco</i> RV_ <i>Kpn</i> I_ <i>Sma</i> I_F	ATGCGGATCCTAGATATCTAGGTACCTACCCGGGATGC	Herstellung des Klonierungslinkers mit Restriktionsschnittstellen für <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RV, <i>Kpn</i> I und <i>Sma</i> I
<i>Bam</i> HI_ <i>Eco</i> RV_ <i>Kpn</i> I_ <i>Sma</i> I_R	GCATCCCGGGTAGGTACCTAGATATCTAGGATCCGCAT	Herstellung des Klonierungslinkers mit Restriktionsschnittstellen für <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RV, <i>Kpn</i> I und <i>Sma</i> I
<i>MSH2</i> _promoter_mut-F	AGGAGGAAGGCTAGT'TTTT'TTGT'TTTCAGTTTCC TTCTG	Ortsspezifische Mutagenese der <i>MSH2</i> -Promotorsequenz
<i>MSH2</i> _promoter_mut-R	CAGAAGGAAACTTGAAAACAACAAAAAACTAGCCTTC CTCCT	Ortsspezifische Mutagenese der <i>MSH2</i> -Promotorsequenz

Tabelle 11: Primer und Sonden für die reverse Transkription und qRT-PCR-Analyse.

Locus	Primer für die reverse Transkription	Forward-Primer für die qRT-PCR	Reverse-Primer für die qRT-PCR	Sonden für die qRT-PCR
<i>EGFP</i>	Oligo d(T) ₁₆	<i>EGFP</i> _UPLF GGGCACAAGCTGGAGTACA	<i>EGFP</i> _UPLR CCTTGATGCCGTTCTTCTG	UPL 5
Exon_2/3	Oligo d(T) ₁₆	rBG_UPLF2 TGTCGAGATCCTGAGAACTTCA	rBG_UPLR2 GATGAGACAGCACAAACCA	UPL 61
<i>GAPDH</i>	Oligo d(T) ₁₆	<i>GAPDH</i> _UPLF2 GCACCAGGTGGTCTCCTCT	<i>GAPDH</i> _UPLR2 TGACAAAGTGGTCGTTGAGG	UPL 25

Die für die Bisulfit-Konvertierung (siehe Kapitel 2.3.19) verwendeten *Primer* weisen nicht-sequenzspezifische *Tag*-Sequenzen auf. An diese Sequenzen binden während der sogenannten Re-PCR (siehe Kapitel 2.3.20) *Primer* mit einer probenspezifischen Identifikationssequenz (MID, engl. *multiplex identifier*) sowie einer Adapter- und Schlüsselsequenz für die Sequenzierung mit dem 454 GS Junior System.

Tabelle 12: Primer für die Methylierungsanalysen der Promotorregionen. Die für die Bisulfit-Konvertierung verwendeten *Primer* weisen nicht-sequenzspezifische *Tag*-Sequenzen auf (unterstrichen dargestellt). An diese *Tag*-Sequenzen binden die MID-*Primer*, die sich aus einer probenspezifischen Identifikationssequenz (MID, rot) und einer Schlüsselsequenz (blau) für die Sequenzierung mit dem 454 GS Junior System (Roche Diagnostics) zusammensetzen.

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
<i>GFP-UBE3A</i> -Ftag	<u>CTTGCTTCCTGGCACGAGG</u> ATTAGGATGGGTATTATTT	Methylierungsanalyse des <i>UBE3A</i> -Testpromotors
<i>UBE3A</i> -CpG-RM13-2	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u> AAAAAATTACCCTTCTATCCAA	Methylierungsanalyse des <i>UBE3A</i> -Testpromotors
<i>GFP</i> -RM13	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u> AAATAAACTTCAAAATCAACTTACC	Methylierungsanalyse des <i>HBA2</i> -Testpromotors
<i>HBA2</i> -CpG-Ftag-1	<u>CTTGCTTCCTGGCACGAGG</u> TGTATTTTATAGGGAGGT	Methylierungsanalyse des <i>HBA2</i> -Testpromotors
<i>HBA2</i> -CpG-Ftag-2	<u>CTTGCTTCCTGGCACGAGG</u> TTTTGTTTAGGTTAAGGGTTA	Methylierungsanalyse des <i>HBA2</i> -Testpromotors
<i>MSH2</i> -CpG-Ftag-1	<u>CTTGCTTCCTGGCACGAG</u> TAGTAAGGAGGTTGTGTAGATAAAATT	Methylierungsanalyse des <i>MSH2</i> -Promotors
<i>MSH2</i> -CpG-RM13-1	<u>CAGGAAACAGCTATGAC</u> ACCCAATCAACTTCCAAAACAC	Methylierungsanalyse des <i>MSH2</i> -Promotors
AutMID4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCACTGTAG <u>CTTGCTTCCTGGCACGAG</u>	Methylierungsanalyse des <i>UBE3A</i> -Testpromotors
ButMID4	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCACTGTAG <u>CAGGAAACAGCTATGAC</u>	Methylierungsanalyse des <i>UBE3A</i> -Testpromotors
AutMID5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACG <u>CTTGCTTCCTGGCACGAG</u>	Methylierungsanalyse des <i>UBE3A</i> -Testpromotors nach Doxycyclin-Behandlung
ButMID5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACG <u>CAGGAAACAGCTATGAC</u>	Methylierungsanalyse des <i>UBE3A</i> -Testpromotors nach Doxycyclin-Behandlung

AutMID9	<u>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGTATCAGCCTTG</u> <u>CTTCCTGGCAGGAG</u>	Methylierungsanalyse des <i>HBA2-long</i> -Testpromotors
ButMID9	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTAGTATCAGCCAG</u> <u>GAAACAGCTATGAC</u>	Methylierungsanalyse des <i>HBA2-long</i> -Testpromotors
AutMID10	<u>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCTATGCGCTTG</u> <u>CTTCCTGGCAGGAG</u>	Methylierungsanalyse des <i>HBA2-long</i> -Testpromotors nach Doxycyclin-Behandlung
ButMID10	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTATGCGCAGG</u> <u>AAACAGCTATGAC</u>	Methylierungsanalyse des <i>HBA2-long</i> -Testpromotors nach Doxycyclin-Behandlung
AutMID14	<u>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGAGAGATACCTT</u> <u>GCTTCCTGGCAGGAG</u>	Methylierungsanalyse des <i>HBA2-short</i> -Testpromotors
ButMID14	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGAGAGATACCAG</u> <u>GAAACAGCTATGAC</u>	Methylierungsanalyse des <i>HBA2-short</i> -Testpromotors
AutMID15	<u>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATACGACGTACTT</u> <u>GCTTCCTGGCAGGAG</u>	Methylierungsanalyse des <i>HBA2-short</i> -Testpromotors nach Doxycyclin-Behandlung
ButMID15	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATACGACGTACAG</u> <u>GAAACAGCTATGAC</u>	Methylierungsanalyse des <i>HBA2-short</i> -Testpromotors nach Doxycyclin-Behandlung
AutMID17	<u>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTCTAGTACCCTTG</u> <u>CTTCCTGGCAGGAG</u>	Methylierungsanalyse des endogenen <i>MSH2</i> -Promotors
ButMID17	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGTCTAGTACCAG</u> <u>GAAACAGCTATGAC</u>	Methylierungsanalyse des endogenen <i>MSH2</i> -Promotors
AutMID18	<u>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTACGTAGCCTTG</u> <u>CTTCCTGGCAGGAG</u>	Methylierungsanalyse des endogenen <i>MSH2</i> -Promotors nach Doxycyclin-Behandlung
ButMID18	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTACGTAGCCAG</u> <u>GAAACAGCTATGAC</u>	Methylierungsanalyse des endogenen <i>MSH2</i> -Promotors nach Doxycyclin-Behandlung
AutMID19	<u>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTACTACTCCTTG</u> <u>CTTCCTGGCAGGAG</u>	Methylierungsanalyse des <i>MSH2</i> -Testpromotors
ButMID19	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTACTACTCCAGG</u> <u>AAACAGCTATGAC</u>	Methylierungsanalyse des <i>MSH2</i> -Testpromotors
AutMID20	<u>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGACTACAGCTTG</u> <u>CTTCCTGGCAGGAG</u>	Methylierungsanalyse des <i>MSH2</i> -Testpromotors nach Doxycyclin-Behandlung
ButMID20	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGACTACAGCAG</u> <u>GAAACAGCTATGAC</u>	Methylierungsanalyse des <i>MSH2</i> -Testpromotors nach Doxycyclin-Behandlung

8.2 DNA-Sequenzen der Testpromotoren

Nachfolgend sind die DNA-Sequenzen der Testpromotoren angegeben, die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendet wurden. Die Sequenzunterschiede zur genomischen DNA der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 sind grau hinterlegt.

```
GGTGACCCTGGTACCAAATATGACTTTAAATGGATTTAATTTTAATGGCTTTAACTACGTTCA
GCTGTCATATGGATCAAAATTAGCCTCTATCCAGCTGGGGTCAACCAGGGAGCCACTTTTCTT
AACCGACGACCTACTGAACGTCAACAACCTGCAGGAGACGGGACTTTACCTTCGTCTCTGGTAA
ACTAGTTGACACATCCTGTGTTGGCAAGAGGCCTAAGTAGATGACCTTGGTCCCTCTAAAATCT
GGCCTGCACTCTCGGGGCACCCCTGCAACATCTACAAAGGCAGCTCCAGATAGAAAAGGGTTG
GGGTCGAAAAGCCAATAACGGCAGGCACCTGCCCCGCCTCGGGGCTGGGGGGCTATTCCAGCG
GCTTCAGCTAACTTTTCAGAGCCATTCGTTTCCCAACAAAGTCTGAGGCGTTCCTCTGCTGGGT
ACACCAAGGGGCTCTGCAACCCCTCTGGGGGGGGGGGTGCCAGAGGGCTTCCGGAAGTCCCA
GGTTTATTCTTTTCGGGTCACAGACAGCAGAACTAAAAAGAGGGATTACCCTTTCTGTCCAGT
CGCAAGATGGCGACCGAGCCTGGTGGGACTCCGAGGGGCCGAGGCCACCTCCTCTTCCCAAT
GGCCCGTGCGCCGGCGGCGACGGCAAGCGGGAGGGAGGCGGGGCCGCGAAGGAAGGAGGGGC
GGAGCGCGGCGCCCTCCCGCGCGTCTTGGCCCCGCCCCACGTCCCCGCGTCCCGGCCTGGAGC
CCTCGCCCCGGCCGGGCGGCGCGCTGCCTGCCGGGATACTCGGCCCGCCCAGCCAGTCCTCC
CGTCTTGCGCCGCGGCCGCGAGATCCGTGTGTCTCTCAAGATGGTGGCGCTGGGCTCGGGGTG
ACTACAGGAGACGACGGGGCCTTTTCCCTTCGCCAGGACCCGACACACCAGGCTTCGCTCGCT
CGCGCACCCCTCCGCGCGTAGCCATCCGCCAGCGCGGGCGCCCGCCATCCGCGCCTACTTA
CGCTTCACCTCT
```

Abbildung 39: *UBE3A*-Testpromotorsequenz. Die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendete Testpromotorsequenz des *UBE3A*-Gens ist in 5′-3′-Orientierung angegeben und umfasst 1020 Basenpaare. Der Basenaustausch an Position 855, welcher zur Unterscheidung des Testpromotors vom endogenen *UBE3A*-Promotor der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 genutzt wurde, ist in der Sequenz grau hinterlegt.


```

TAGTAGAGACGGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGCCTGGTCTCGAACTCCCGACCTCAGCTGATC
CACCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGAGCCTGGCCAAACC
ATCACTTTTTCATGAGCAGGGATGCACCCACTGGCACTCCTGCACCTCCCACCCCTCCCCCTCGC
CAAGTCCACCCCTTCCTTCCTCACCCACATCCCCTCACCTACATTCTGCAACCACAGGGGCC
TTCTCTCCCCTGTCTTTTCCCTACCCAGAGCCAAGTTTGTTTATCTGTTTACAACCAGTATTT
ACCTAGCAAGTCTTCCATCAGATAGCATTTGGAGAGCTGGGGGTGTCACAGTGAACCACGACC
TCTAGGCCAGTGGGAGAGTCAGTCACACAACTGTGAGTCCATGACTTGGGGCTTAGCCAGTA
CCCACCACCCACGCGCCACCCACAACCCGGGTAGAGGAGTCTGAATCTGGAGCCGCCCCC
AGCCCAGCCCCGTGCTTTTTTGCCTGCTGTTTGTTCCTTCCCGGTGCCTGTCACTCAAGCA
CACTAGTGACTATCGCCAGAGGGAAAGGGAGCTGCAGGAAGCGAGGCTGGAGAGCAGGAGGGG
CTCTGCGCAGAAATTCTTTTGAGTTCCTATGGGCCAGGGCGTCCGGGTGCGCGCATTCCTCTC
CGCCCCAGGATTGGGCGAAGCCTCCCGGCTCGCACTCGCTCGCCCGTGTGTTCCCCGATCCCG
CTGGAGTCGATGCGCGTCCAGCGCGTGCCAGGCCGGGGCGGGGTGCGGGCTGACTTTCTCCC
TCGCTAGGGACGCTCCGGCGCCCCGAAAGGAAAGGGTGGCGCTGCGCTCCGGGGTGCACGAGCC
GACAGCGCCCGACCCCAACGGGGCCGGCCCCGCCAGCGCCGCTACCGCCCTGCTCCCGGGCGAG
CGGGATGGGCGGGAGTGGAGTGGCGGGTGGAGGGTGGAGACGTCCTGGCCCCCGCCCCGCGTG
CACCCCCAGGGGAGGCCGAGCCCGCCGCCCGGGCCCCGCGCAGGCCCGCCCGGGACTCCCCTG
CGGTCCAGGCCGCGCCCCGGGCTCCGCGCCAGCCAATGAGCGCCGCCCGGGCGGGCGTGCCCC
CGCGCCCCAAGCATAAACCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGGCACTCTTCTGGTCCCCACAGACTC
AGAGAGAACCCACC

```

Abbildung 40: *HBA2-short*-Testpromotorsequenz. Die Testpromotorsequenz *HBA2-short*, welche für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendet wurde, ist in 5'-3'-Orientierung angegeben und umfasst 1211 Basenpaare. Die Sequenzunterschiede zum endogenen Promotor der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 sind in der Sequenz grau hinterlegt. Sie umfassen die SNPs rs2541669, rs200340576 sowie rs187887324 und zwei Basenaustausche an Position 716/717.

```

TAGTAGAGACGGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGCCTGGTCTCGAACTCCCGACCTCAGCTGATC
CACCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGAGCCTGGCCAAACC
ATCACTTTTTCATGAGCAGGGATGCACCCACTGGCACTCCTGCACCTCCCACCTCCCCCTCGC
CAAGTCCACCCCTTCCTTCTCACCCACATCCCCTCACCTACATTCTGCAACCACAGGGGCC
TTCTCTCCCCTGTCTTTTCCCTACCCAGAGCCAAGTTTGTTTATCTGTTTACAACCAGTATTT
ACCTAGCAAGTCTTCCATCAGATAGCATTTGGAGAGCTGGGGGTGTCACAGTGAACCACGACC
TCTAGGCCAGTGGGAGAGTCAGTCACACAACTGTGAGTCCATGACTTGGGGCTTAGCCAGTA
CCCACCACCCACGCGCCACCCACAACCCCGGGTAGAGGAGTCTGAATCTGGAGCCGCCCCC
AGCCCAGCCCCGTGCTTTTTTGCGTCCTGGTGTGTTGTTCCCTCCCGGTGCCTGTCAAGCA
CACTAGTGACTATCGCCAGAGGGAAAGGGAGCTGCAGGAAGCGAGGCTGGAGAGCAGGAGGGG
CTCTGCGCAGAAATTCTTTTGAGTTCCATATGGGCCAGGGCGTCCGGGTGCGCGCATTCCTCTC
CGCCCCAGGATTGGGCGAAGCCTCCCGGCTCGCACTCGCTCGCCCGTGTGTTCCCCGATCCCG
CTGGAGTCGATGCGCGTCCAGCGCGTGCCAGGCCGGGGCGGGGTGCGGGCTGACTTTCTCCC
TCGCTAGGGACGCTCCGGCGCCCCGAAAGGAAAGGGTGGCGCTGCGCTCCGGGGTGACAGAGCC
GACAGCGCCCGACCCCAACGGGGCCGGCCCCGCCAGCGCCGCTACCGCCCTGCTCCCGGGCGAG
CGGGATGGGCGGGAGTGGAGTGGCGGGTGGAGGGTGGAGACGTCCTGGCCCCCGCCCCGCGTG
CACCCCCAGGGGAGGCCGAGCCCGCCGCCCGCCCCGCGCAGGCCCGCCCCGGGACTCCCCTG
CGGTCCAGGCCGCGCCCCGGGCTCCGCGCCAGCCAATGAGCGCCGCCCGGCCGGGCGTGCCCC
CGCGCCCCAAGCATAAACCTGGCGCGCTCGCGGCGCGGCACTCTTCTGGTCCCCACAGACTC
AGAGAGAACCCACCATGGTGCTGTCTCCTGCCGACAAGACCAACGTCAAGGCCGCTGGGGTA
AGGTCGGCGCGCACGCTGGCGAGTATGGTGCGGAGGCCCTGGAGAGGTGAGGCTCCCTCCCCT
GCTCCGACCCGGGCTCCTCGCCCGCCCGGACCCACAGGCCACCCTCAACCGTCCTGGCCCCGG
ACCCAAACCCACCCCTCACTCTGCTTCTCCCCGCAGGATGTTCCCTGTCCTTCCCCACCACCA
AGACCTACTTCCCGCACTTCGACCTGAGCCACGGCTCTGCCAGGTTAAGGGCCACGGCAAGA
AGGTGGCCGACGCGCTGACCAACGCCGTGGCGCACGTGGACGACATGCCCAACGCGCTGTCCG
CCCTGAGCGACCTGCACGCGCACAAGCTTCGGGTGGACCCGGTCAACTTCAAGGTGAGCGGCG
GGCCGGGAGCGATCTGGGTGAGGGGCGAGATGGCGCCTTCTCTCAGGGCAGAGGATCACGC
GGGTTGCGGGAGGTGTAGCGCAGGCGGCGGCTGCGGGCCTGGGCCGCACTGACCCTCTTCTCT
GCACAGCTCCTAAGC

```

Abbildung 41: *HBA2-long*-Testpromotorsequenz. Die für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendete Testpromotorsequenz *HBA2-long* ist in 5′-3′-Orientierung angegeben und umfasst 1779 Basenpaare. Die Sequenzunterschiede zum endogenen Promotor der Zelllinie Flp-In™ T-REx™ 293 sind in der Sequenz grau hinterlegt und umfassen die SNPs rs2541669, rs200340576 sowie rs187887324 und zwei Basenaustausche an Position 716/717.

```
GGGACATAGCAGGCCATATAAATGTTTTCGAATGAGTGAATCATCAACGAGTGGATGAAACGA
TAATGTGGCTAACAGGCAGCAGTAAGGAGGCTGTGTAGAATAAACCCGTAATCCCGATGTTGG
CAGTTTGCTTAGAAAAGAAAAAGGGAGGCAGTCGGAGAGGGGCACACGTTTTTAACAAAATACTG
GGAGGAGGAGGAAGGCTAGTTTTTTTGGTTGTTTCAAGTTTCCTTCTGATGTTACTCCCATGC
TTCCGGGCACATTACGAGCTCAGTGCCTGCCGGAATCTCCCACCTGGTGGCAACCTACCCTT
GCATACACCCCACCCAGGGGCTTCAAGCCTTGACAGCTGAGTAAACACAGAAAGGAGCTCTACT
AAGGATGCGCGTCTGCGGGTTTCCGCGCGACCTAGGCGCAGGCATGCGCAGTAGCTAAAGTCA
CCAGCGTGCGCGGGAAGCTGGGCCGCGTCTGCTTATGATTGGTTGCCGCGGCAGACTCCCACC
CACCGAAACGCAGCCCTGGAAGCTGATTGGGTGTGGTTCGCCGTGGCCGGACGCCGCTCGGGGG
ACGTGGGAGGGGAGGCGGGAAACAGCTTAGTGGGTGTGGGGTCGCGCATTTTCTTCAACCAGG
AGGTGAGGAGGTTTCGACATGGCGGTGCAGCCGAAGGAGACGCTGCAGTTGGAGAGCGCGGCC
GAGGTCGGCTTCGTGCGCTTCTTTCAGGGCATGCCGAGAAGCCGACCACCACAGTGCGCCTT
TTCGACCGGGGCGACTTCTATACGGCGCACGGCGAGGACGCGCTGCTGGCCGCCCCGGGAGGTG
TTCAAGACCCAGGGGGTGATCAAGTACATGG
```

Abbildung 42: *MSH2*-Testpromotorsequenz. Die Sequenz des *MSH2*-Testpromotors, welcher für die Etablierung des Zellkulturmodells verwendet wurde, ist in 5'-3'-Orientierung angegeben und umfasst 850 Basenpaare. Der Basenaustausch, welcher zur Unterscheidung vom endogenen *MSH2*-Promotor der Flp-In™-T-REx™-293-Zellen genutzt wurde, umfasst den SNP rs1863332 und ist in der Sequenz grau hinterlegt.

8.3 Plasmidkarten

Im Folgenden sind die Plasmidkarten der Konstrukte aufgeführt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert wurden. Diese wurden mit dem Programm *Geneious 8.1.5* (Biomatters, Auckland, Neuseeland) erstellt.

8.3.1 Plasmid für den Transkriptabbruch der lncRNA *Snhg14*

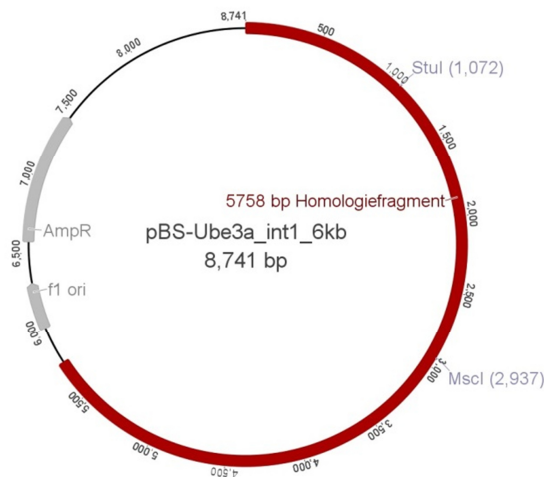


Abbildung 43: Plasmidkarte von pBS-Ube3a_int1_6kb. Der Klonierungsvektor pBluescript II KS(+) (grau) beinhaltet die zu Intron 1 des *Ube3a*-Gens homologe Sequenz von 5758 Basenpaaren Länge. Für die Integration der transkriptionellen Stoppkassette sollte die *MscI*- oder *StuI*-Restriktionsschnittstelle genutzt werden.

8.3.2 Plasmide für die Etablierung des Zellkulturmodells

8.3.2.1 Plasmide für die Promotoraktivitätsanalysen

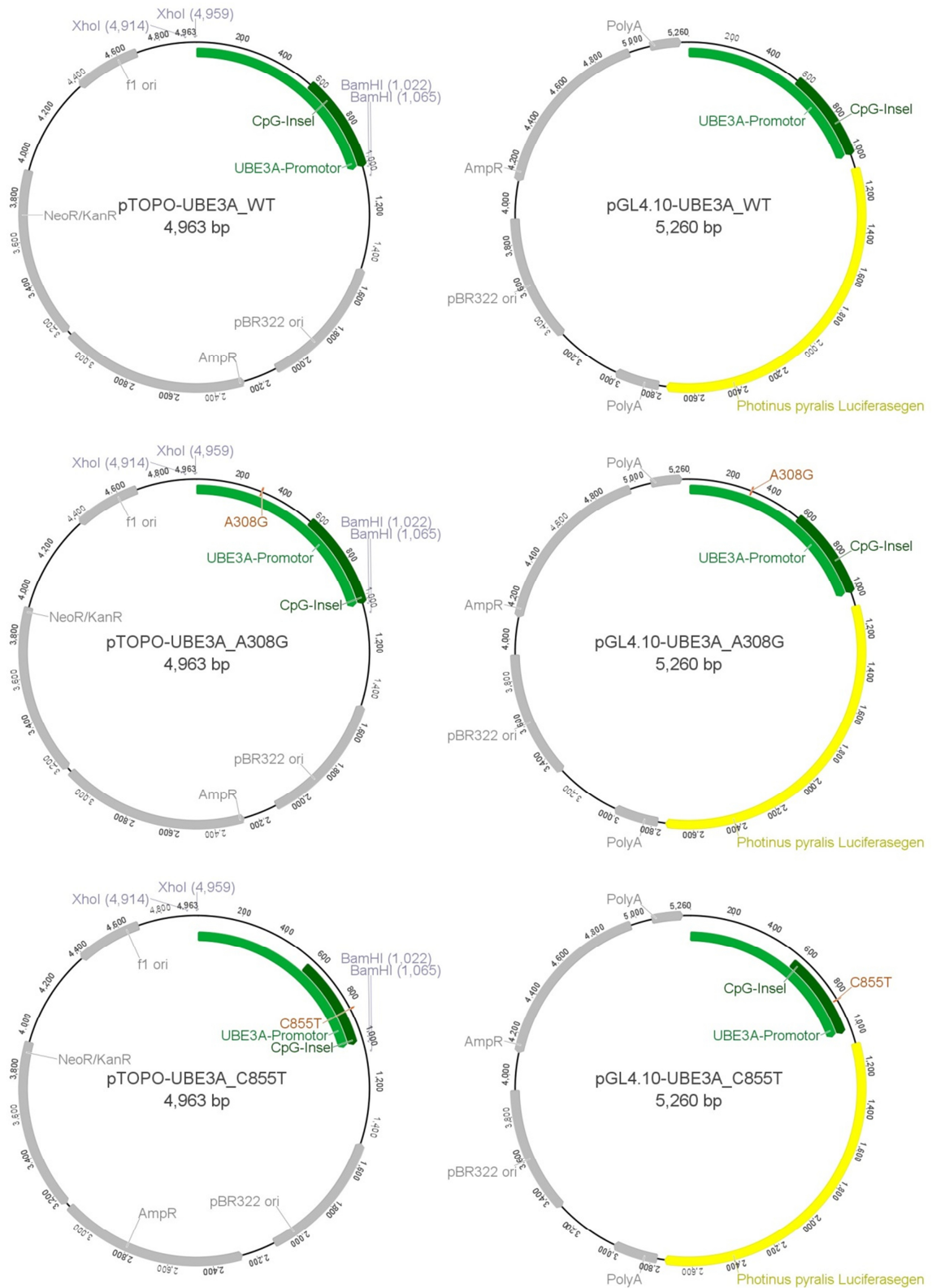


Abbildung 44: Plasmidkarten der UBE3A-Konstrukte. Die PCR-Produkte des UBE3A-Promotors (grün) mit CpG-Inselle (dunkelgrün) wurden in den TOPO-Vektor pCR™2.1 integriert und anschließend mithilfe der Restriktionsendonukleasen XhoI und BamHI ausgeschnitten und in den pGL4.10-Expressionsvektor mit dem *Photinus pyralis*-Luciferasegen (gelb) kloniert.

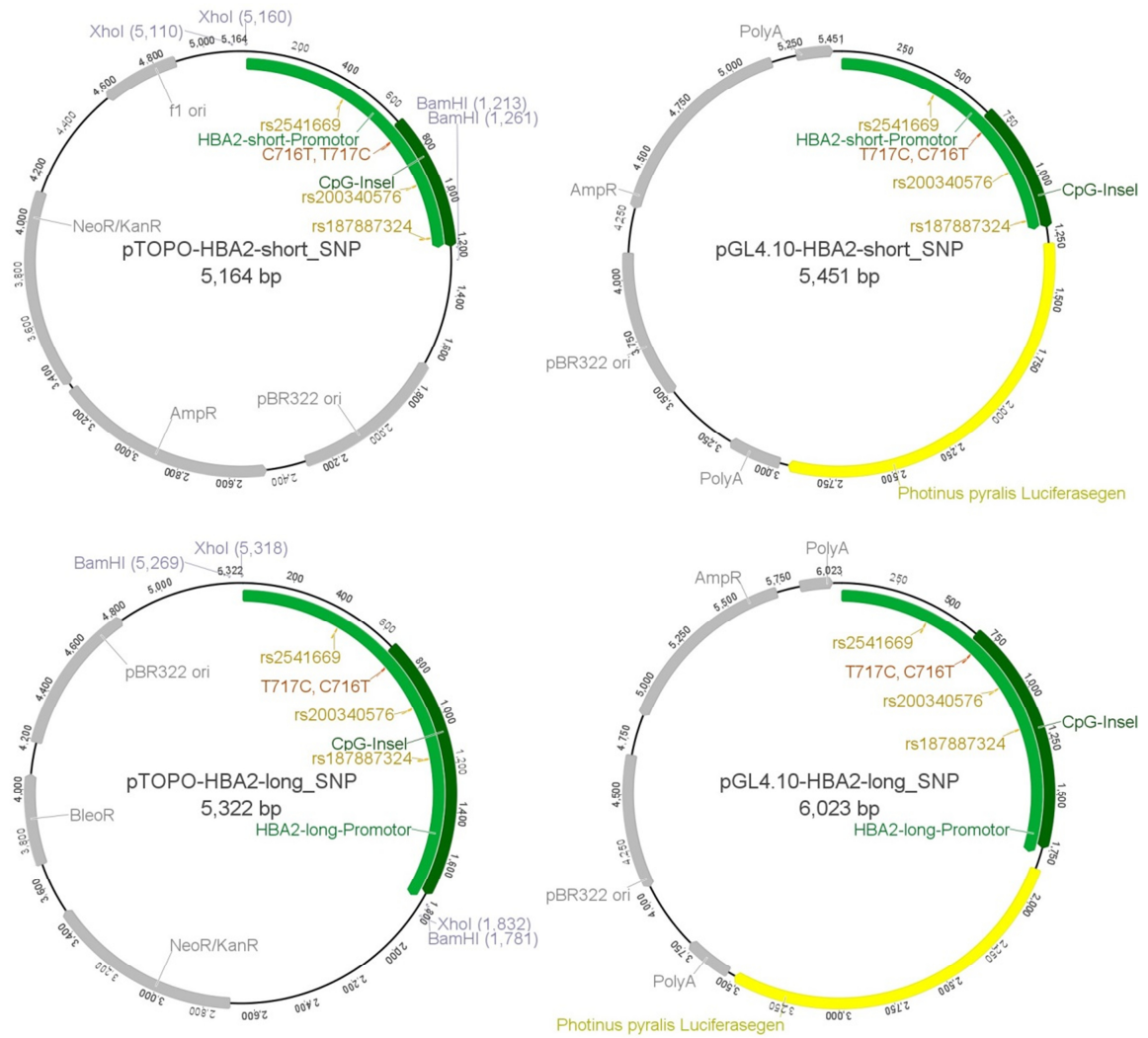


Abbildung 45: Plasmidkarten der HBA2-Konstrukte. Die PCR-Produkte des HBA2-Promotors (grün) mit CpG-Insel (dunkelgrün) wurden in den TOPO-Vektor pCR™2.1 bzw. pCR™-Blunt II-TOPO® integriert. Anschließend wurde der jeweilige Promotor mithilfe der Restriktionsendonukleasen XhoI und BamHI ausgeschnitten und in den pGL4.10-Expressionsvektor mit dem *Photinus-pyralis*-Luciferasegen (gelb) kloniert.

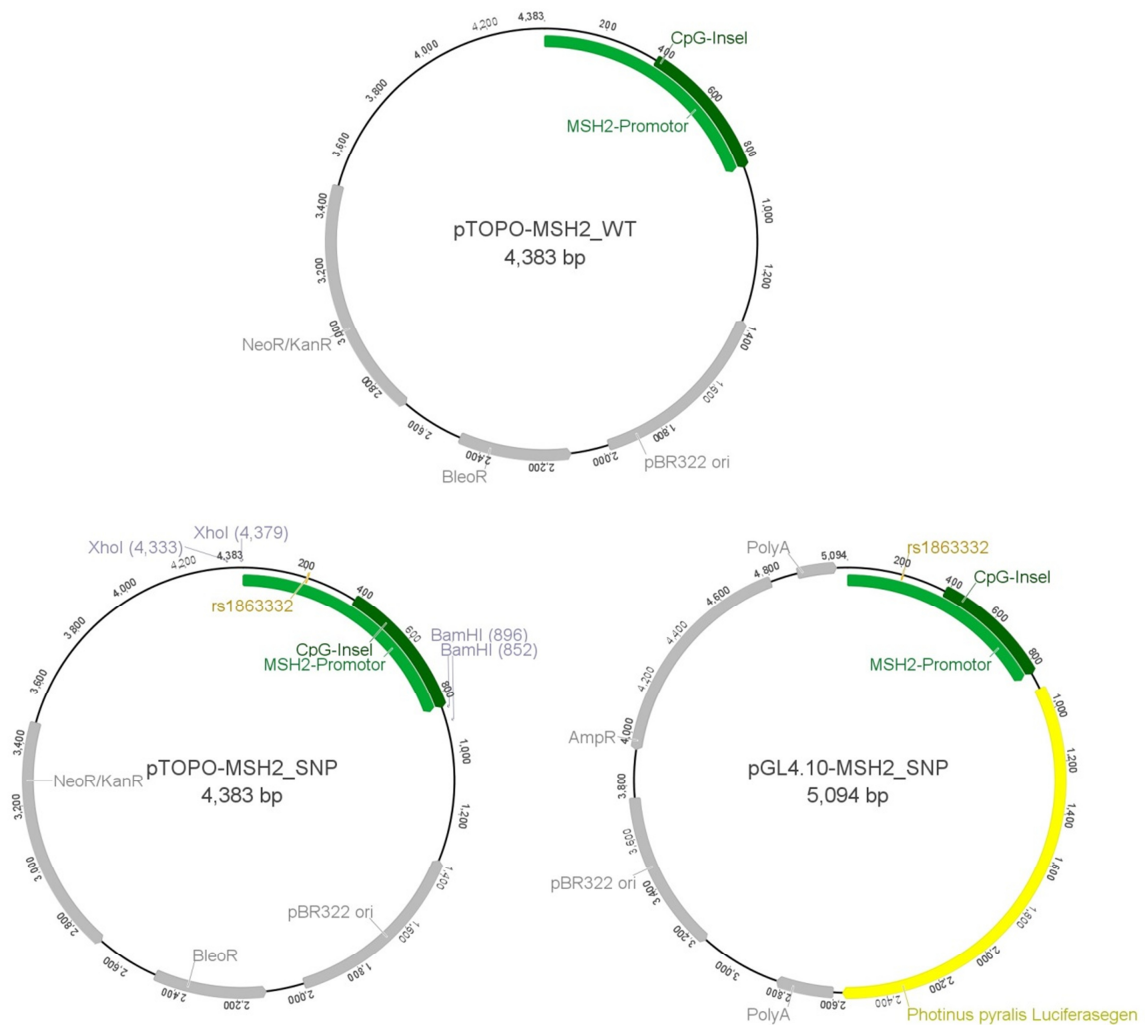


Abbildung 46: Plasmidkarten der *MSH2*-Konstrukte. Der Wildtyp *MSH2*-Promotor (grün) mit CpG-Insel (dunkelgrün) wurde in den TOPO-Vektor pCR™-Blunt II-TOPO® integriert und mit ortsspezifischer Mutagenese ein Basenaustausch, entsprechend dem natürlich vorkommenden SNP rs1863332, durchgeführt. Anschließend wurde der *MSH2*-Promotor mit SNP mithilfe der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BamHI* ausgeschnitten und in den pGL4.10-Expressionsvektor mit dem *Photinus pyralis*-Luciferasegen (gelb) kloniert.

8.3.2.2 Plasmide für die Herstellung stabiler Zelllinien

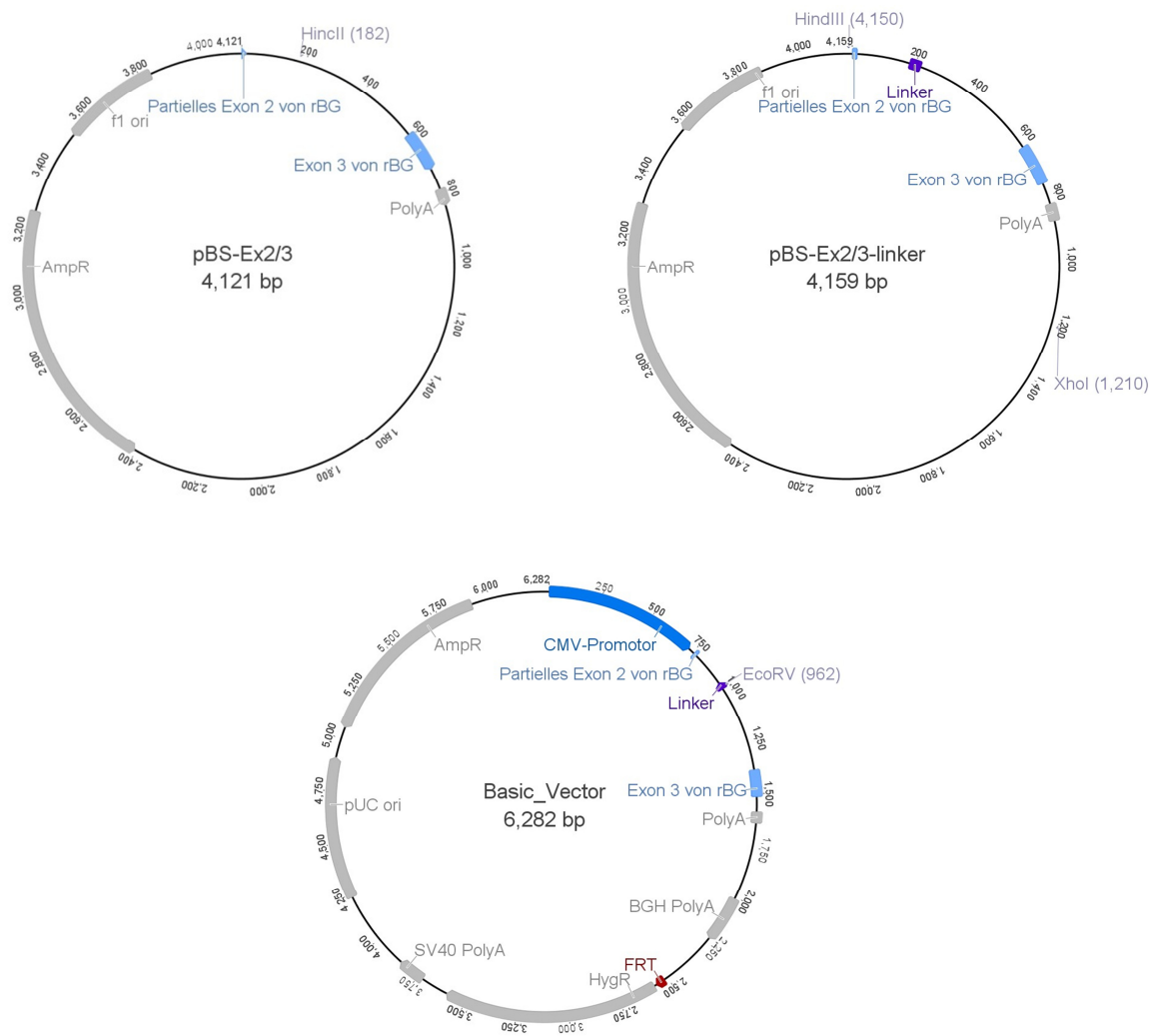


Abbildung 47: Plasmide für die Herstellung des *Basic_Vectors*. Für die Herstellung des *Basic_Vectors* wurde das partielle Exon 2 (hellblau) sowie das vollständige Intron 2 und Exon 3 (hellblau) des β -Globingens des Kaninchens (Exon_2/3) in den Klonierungsvektor pBluescript II KS(+) kloniert und anschließend ein Klonierungslinker (violett) in die *HincII*-Restriktionsschnittstelle integriert. Danach wurde das Exon_2/3 zusammen mit dem Klonierungslinker mithilfe der Restriktionsendukleasen *HindIII* und *XhoI* ausgeschnitten und in das Plasmid pcDNA5/FRT/TO mit dem induzierbaren *CMV*-Promotor (blau) insertiert. Mit diesem Konstrukt wurden Flp-In™-T-REx™-293-Zellen stabil transfiziert.

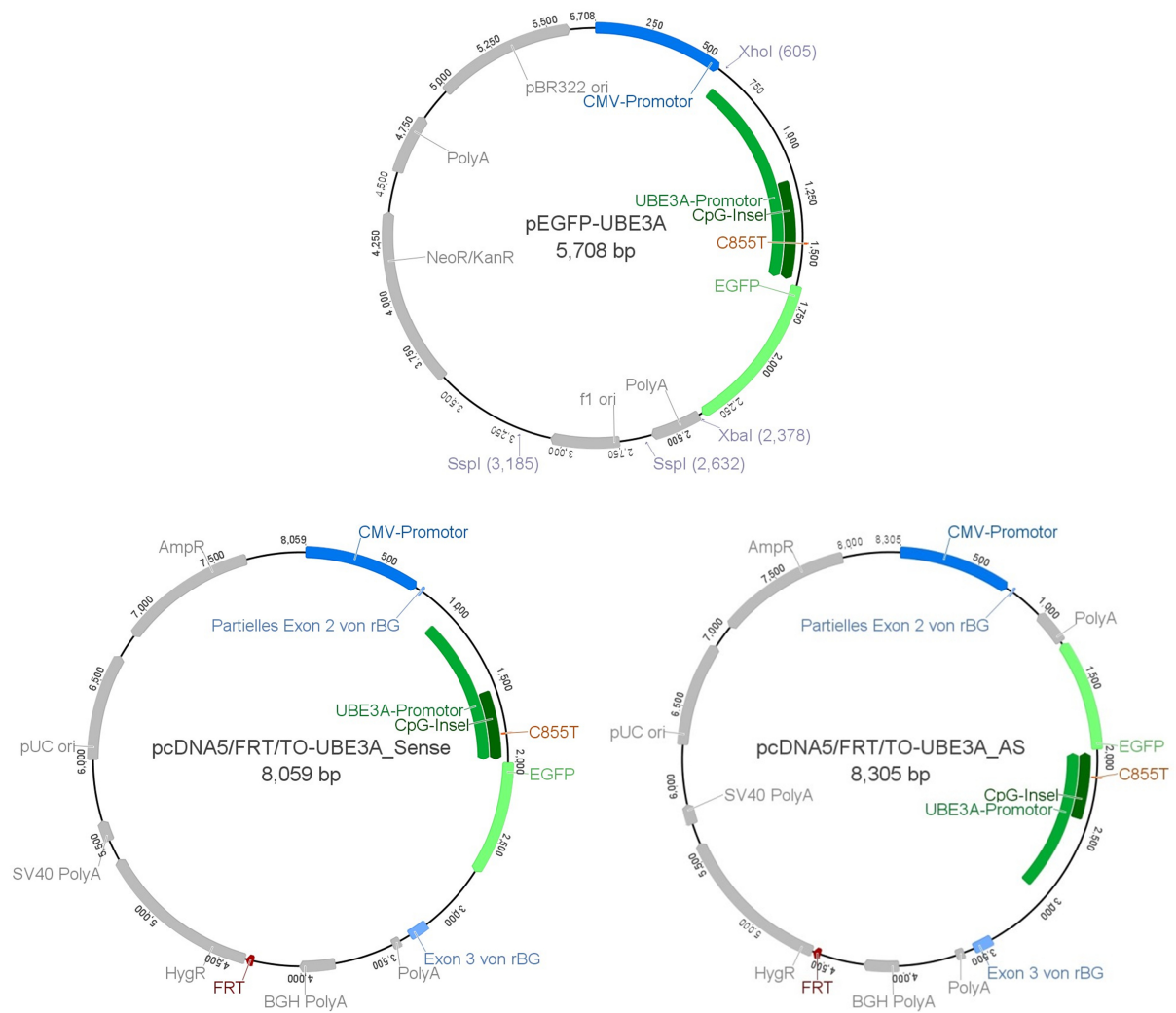


Abbildung 48: Plasmide für die Herstellung der *UBE3A_Sense*- und *UBE3A_AS*-Zelllinien. Für die Herstellung der *UBE3A_Sense*- und *UBE3A_AS*-Zelllinie wurde der *UBE3A*-Testpromotor (grün) in das Plasmid *pEGFP_N3* kloniert. Anschließend wurde der Testpromotor zusammen mit dem *EGFP*-Gen (hellgrün) für das *Sense*-Konstrukt mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *XbaI* und für das *Antisense*-Konstrukt mit *XhoI* und *SspI* ausgeschnitten und in das Plasmid *Basic_Vector* kloniert. Mit den *Sense*- und *Antisense*-Konstrukten wurden Flp-In™-T-REx™-293-Zellen stabil transfiziert.

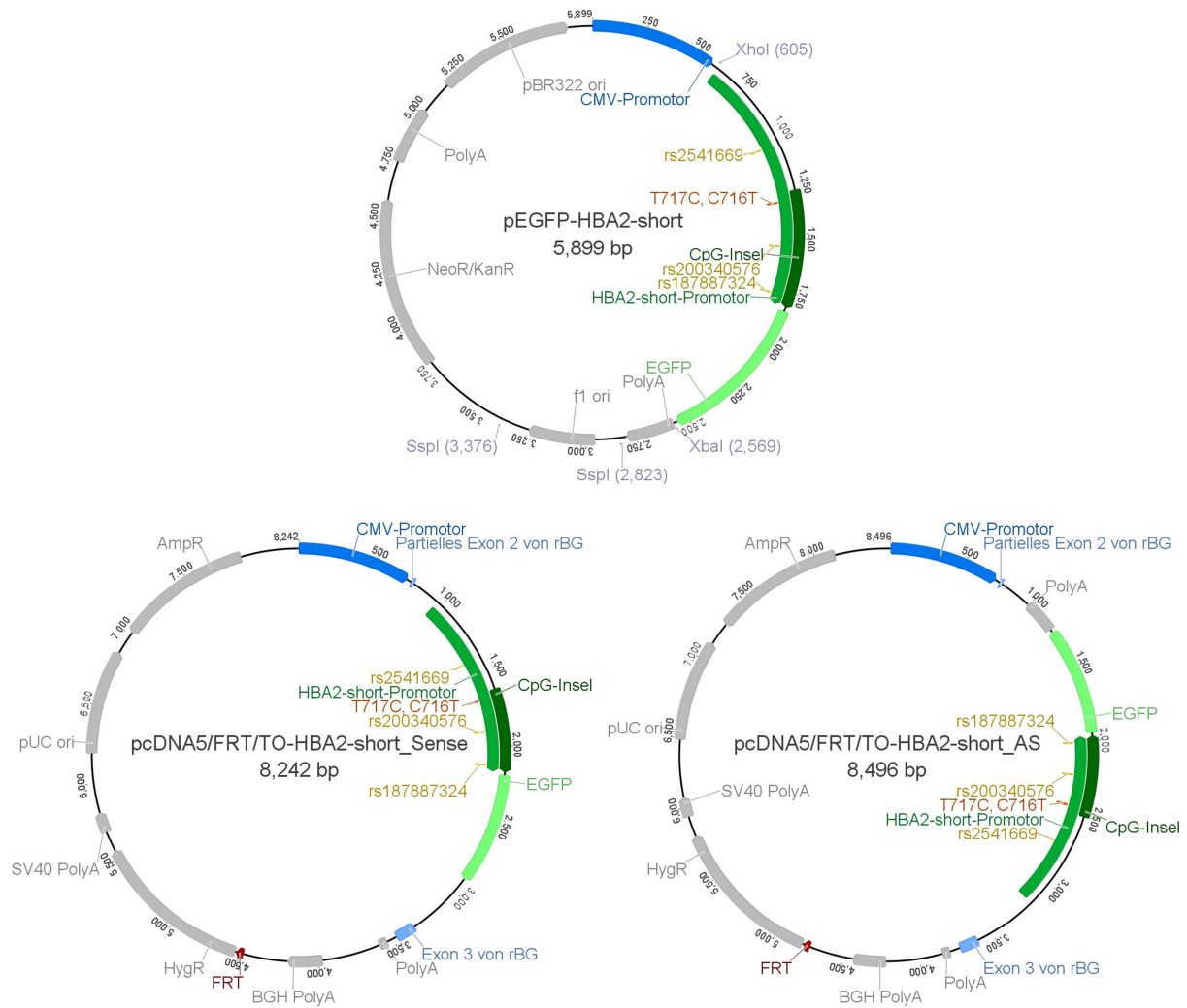


Abbildung 49: Plasmide für die Herstellung der *HBA2-short_Sense*- und *HBA2-short_AS*-Zelllinien. Für die Herstellung der *HBA2-short_Sense*- und *HBA2-short_AS*-Zelllinien wurde der *HBA2-short*-Testpromotor (grün) in das Plasmid pEGFP_N3 kloniert. Anschließend wurde der Testpromotor zusammen mit dem *EGFP*-Gen (hellgrün) für das *Sense*-Konstrukt mit den Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Xba*I und für das *Antisense*-Konstrukt mit *Xho*I und *Ssp*I ausgeschnitten und in das Plasmid *Basic_Vector* kloniert. Mit den *Sense*- und *Antisense*-Konstrukten wurden Flp-In™-T-REx™-293-Zellen stabil transfiziert.

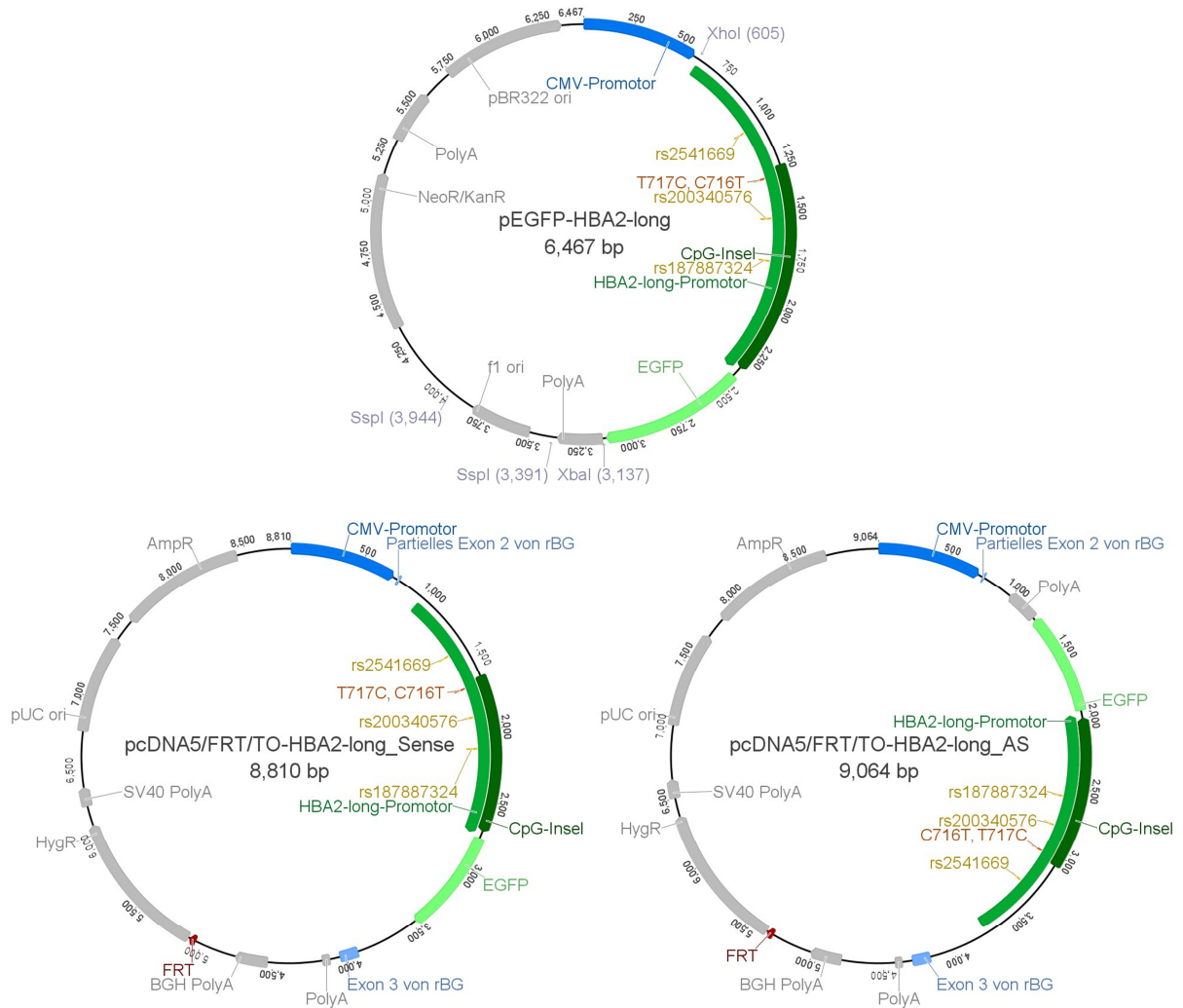


Abbildung 50: Plasmide für die Herstellung der HBA2-long_Sense- und HBA2-long_AS-Zelllinien. Für die Herstellung der HBA2-long_Sense- und HBA2-long_AS-Zelllinien wurde der HBA2-long-Testpromotor (grün) in das Plasmid pEGFP_N3 kloniert. Anschließend wurde der Testpromotor zusammen mit dem EGFP-Gen (hellgrün) für das Sense-Konstrukt mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und XbaI und für das Antisense-Konstrukt mit XhoI und SspI ausgeschnitten und in das Plasmid Basic_Vector kloniert. Mit den Sense- und Antisense-Konstrukten wurden Flp-In™-T-REx™-293-Zellen stabil transfiziert.

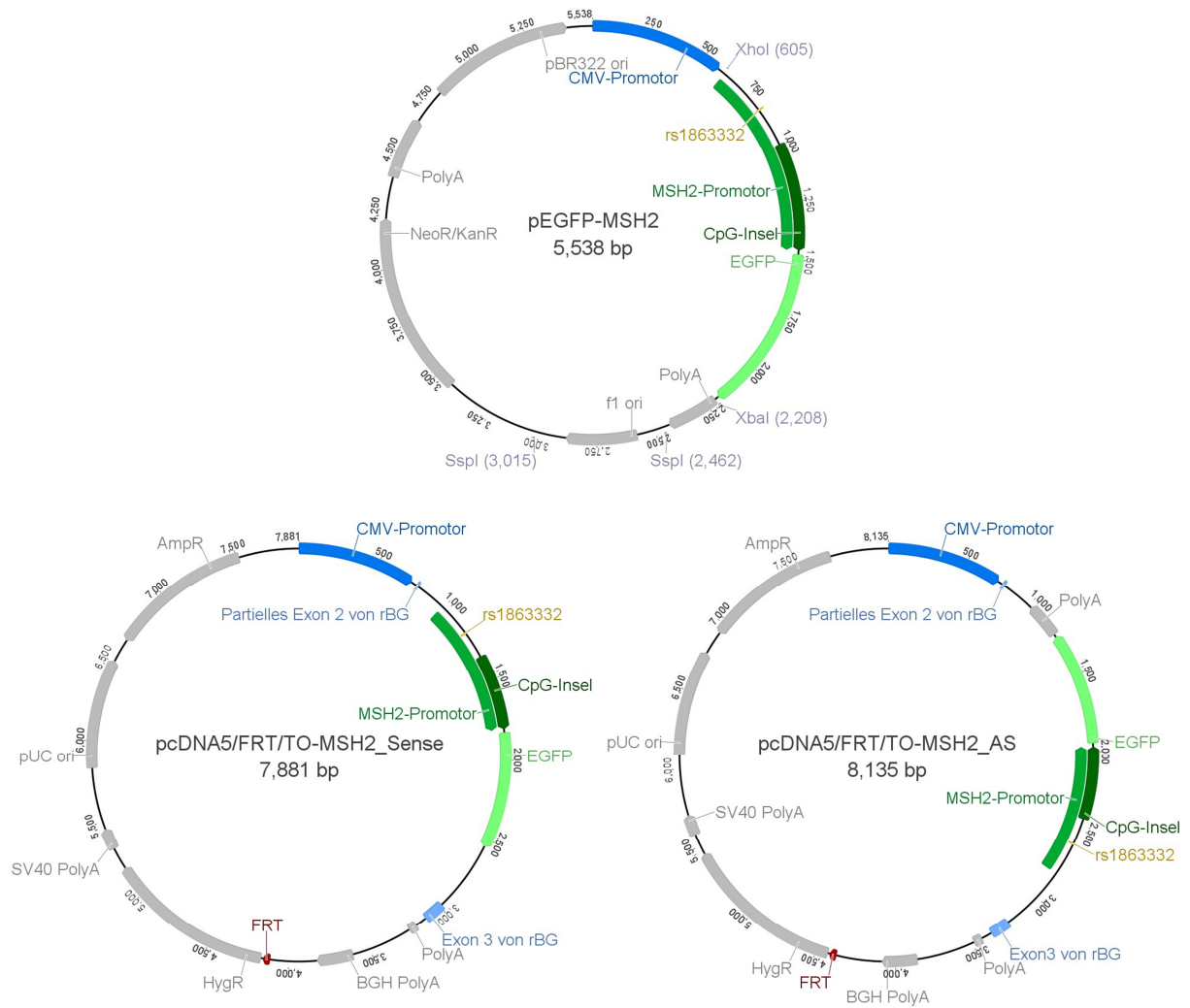


Abbildung 51: Plasmide für die Herstellung der *MSH2_Sense*- und *MSH2_AS*-Zelllinien. Für die Herstellung der *MSH2_Sense*- und *MSH2_AS*-Zelllinien wurde der *MSH2*-Testpromotor (grün) in das Plasmid *pEGFP_N3* kloniert. Anschließend wurde der Testpromotor zusammen mit dem *EGFP*-Gen (hellgrün) für das *Sense*-Konstrukt mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *XbaI* und für das *Antisense*-Konstrukt mit *XhoI* und *SspI* ausgeschnitten und in das Plasmid *Basic_Vector* kloniert. Mit den *Sense*- und *Antisense*-Konstrukten wurden Flp-In™-T-REx™-293-Zellen stabil transfiziert.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke danke ich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Zudem bin ich für die ausgezeichnete fachliche Unterstützung, die wertvollen Anregungen und die Gelegenheit an internationalen und nationalen Konferenzen sowie dem Graduiertenkolleg teilnehmen zu können, sehr dankbar.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Laura Steenpaß. Bei ihr möchte ich mich vor allem für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung, die großartige Unterstützung, die guten Ratschläge und die wertvollen Diskussionen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Des Weiteren möchte ich Michaela Hiber für ihre technische Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Bei den aktiven und ehemaligen Mitgliedern des Instituts für Humangenetik, insbesondere Jana Staňurová, Nadja Utz, Jasmin Beygo, Hannah Demond, Deniz Kanber, Katrin Grothaus, Christian Grosser und Tea Berulava, möchte ich mich für die interessanten Diskussionen, die großartige Hilfsbereitschaft, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die geselligen Stunden außerhalb der Arbeitszeit bedanken. Zusätzlich dazu möchte ich Jana Staňurová auch für die gelegentliche Versorgung meiner Zelllinien und für die damit verbundenen Kuchen danken.

Zuletzt möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mich auf meinem Bildungs- und Lebensweg stets unterstützt und in meinen Entscheidungen bestärkt haben.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Etablierung eines induzierbaren Zellkulturmodells zur Untersuchung transkriptioneller Interferenz“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Helena Sophie Barbara Heinz befürworte.

Essen, den _____	_____	_____
	Name des wissenschaftl. Betreuers/Mitglied der Universität Duisburg-Essen	Unterschrift des wissenschaftl. Betreuers/Mitglied der Universität Duisburg-Essen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____	_____
	Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____	_____
	Unterschrift des/r Doktoranden/in